

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

POSTGRADUÁLNÍ DOKTORSKÉ STUDIUM BIOMEDICÍNY
OBOROVÁ RADA: BIOLOGIE A PATOLOGIE BUŇKY

DISERTAČNÍ PRÁCE

CYRIL ŠÁLEK

Praha 2009

OBSAH

1.	ÚVOD	4
1.1.	Epidemiologie	5
1.2.	Rizikové faktory	10
1.2.1.	Faktory zevního prostředí	10
1.2.2.	Endogenní faktory	13
1.3.	Molekulární genetik a	20
1.3.1.	Genetické změny v onkogenních signálních drahách	21
1.3.2.	Genetické změny v signálních drahách ovlivňovaných tumor supresorovými geny	23
1.4.	Histologická klasifikace	28
1.4.1.	Duktální adenokarcinom	29
1.4.2.	Prekurzorové intraduktální léze	31
	Literatura	37
2.	CÍLE PRÁCE	41
3.	VÝSLEDKY	42
	• Šálek C, Zavoral M, Benešová-Mináriková L, Jelínková M, Traboulsi E, Hrabal P, 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.	43
	• Šálek C, Benešová L, Zavoral M, Nosek V, Kašperová L, Ryska M, Strnad R, Traboulsi E, Minárik M. Evaluation of 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.	54
	• 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.	74
4.	SHRNUTÍ A ZHODNOCENÍ CÍLŮ PRÁCE	92
5.	SUMMARY	96
6.	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ A ODBORNÉ AKTIVITY	98

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych na tomto místě poděkoval všem, kteří přispěli svými zkušenostmi, spoluprací a podporou ke zdárnému dokončení tohoto projektu, jmenovitě pak:

- svým školitelům: **pplk. prof. MUDr. Miroslavu Zavoralovi, Ph.D.** za vedení práce, cenné připomínky týkající se klinické části projektu a to, že mi dovolil skloubit klinickou a laboratorní práci; a **RNDr. Marku Minárikovi, Ph.D.**, který umožnil realizaci experimentální části projektu ve své laboratoři, odborně mě vedl od přípravy grantové přihlášky až k publikaci společných závěrů a průběžně se mnou konzultoval dílčí výsledky;
- **RNDr. Lucii Benešové, Ph.D.** z laboratoře molekulární genetiky a onkologie Genomac International s.r.o., která mě učila všechny relevantní laboratorní techniky a měla cenné metodologické připomínky v průběhu práce na projektu;
- kolegyním z laboratoře molekulární genetiky a onkologie Genomac International s.r.o., zejména **ing. Míše Hrabíkové, ing. Radce Slováčkové, ing. Lucii Fantové, Mgr. Lucii Kašperové a Barboře Belšánové** za spolupráci při laboratorních analýzách;
- **prim. MUDr. Vladimíru Noskovi**, který prováděl všechna endosonografická vyšetření, byl mým učitelem v zobrazovacích technikách a trpělivě vyhověl všem mým požadavkům na opakované odběry cytologických vzorků při jejich nedostatečné validitě po on-site mikroskopickém zhodnocení;
- **plk. prof. MUDr. Miroslavu Ryskovi, CSc.** a **MUDr. Robinu Strnadovi**, kteří byli mými spojenci na Chirurgické klinice ÚVN a 2. LF UK, operovali naše společné pacienty a dodávali vzorky resekátů pro účely molekulárněgenetických analýz;
- **MUDr. Evě Traboulsi** z patologického oddělení ÚVN, která byla mou průvodkyní úskalími cytologické diagnostiky karcinomu pankreatu a která definitivně odečítala všechny nátěry pro účely této studie;
- **Mgr. Jeleně Skibové** za spolupráci při statistickém zpracování výsledků;
- mým kolegům z lůžkového oddělení Interní kliniky ÚVN a 1. LF UK, na jejichž bedra spadly některé z mých klinických povinností v době, kdy jsem pracoval v laboratoři;
- Interní grantové agentuře Ministerstva zdravotnictví ČR za finanční podporu grantového projektu 8027-3.

duben 2009

Cyril Šálek

1. ÚVOD

Zhoubné novotvary slinivky břišní zůstávají přes ohromný pokrok v poznání molekulárně-biologických procesů účastných jejich patogeneze a navzdory novým diagnostickým možnostem nejobávanější chorobou v oboru gastroenterologie a spolu s tumory podjaterní krajiny i v oboru samotné onkologie. Naznačená skepse odráží nemohoucnost moderní medicíny v léčbě tohoto onemocnění, která je v naprosté většině spojena s infaustní prognózou nemocných. Příčinou je především pozdní nástup příznaků, a tudíž i pozdní diagnostika vedoucí k záchytu onemocnění v pokročilých, již inoperabilních stádiích.

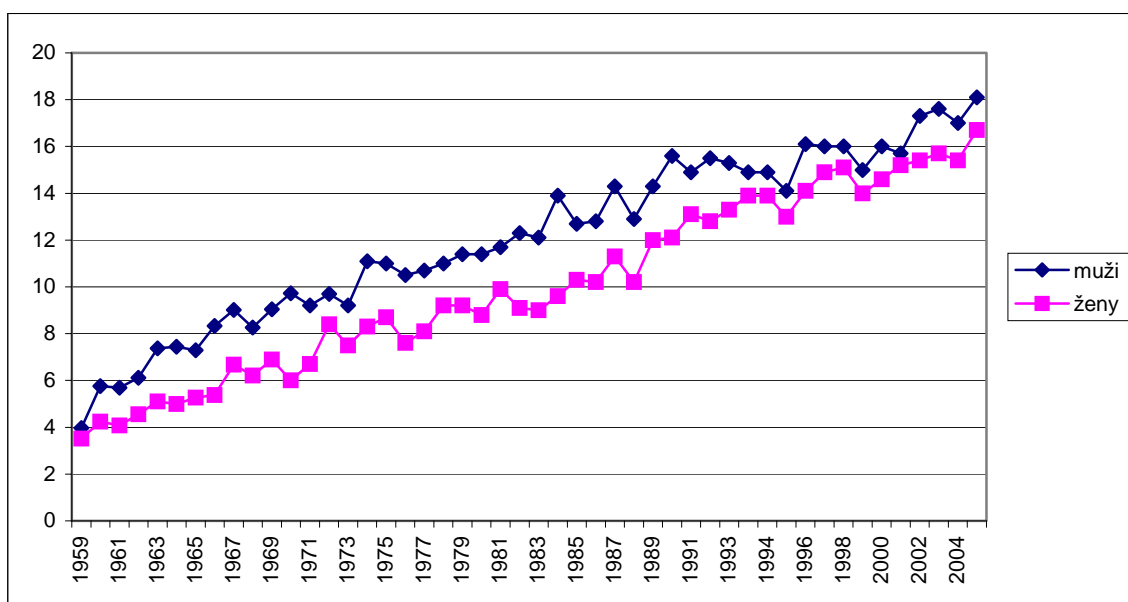
Pankreas je žlázou s funkcí endokrinní i exokrinní; pojmem karcinom pankreatu označujeme výhradně tumory vycházející z exokrinních struktur slinivky břišní. V naprosté většině případů se jedná o solidní adenokarcinom, cystické tumory představují méně než 5% diagnostikovaných novotvarů. Původ maligních elementů je odvozován z epitelu pankreatických vývodů, pouhé jedno procento karcinomů vychází z buněk acinů. Ostatní nádorové formy se vyskytují raritně, z nich nejčastější jsou karcinomy adenoskvamózní, obrovskobuněčné a sarkomatoidní.

1.1. EPIDEMIOLOGIE

Incidence

Incidence nádorů pankreatu jeví neustálý nárůst, přičemž maxima dosahuje na severoamerickém kontinentě, v Evropě a Japonsku, zatímco v zemích Afriky, Střední a Jižní Ameriky, Asie a Oceánie nabývá významně nižších hodnot. Standardizovaná incidence karcinomu pankreatu v USA se udává u mužů 10,2 / 100.000, u žen 7,8 / 100.000 a jeví pomalý pokles (1). V České republice dosahují poslední publikovaná data přepočtená na světový standard výše 11,3 / 100.000 u mužů a 7,5 / 100.000 u žen, což odpovídá více než 1800 nově diagnostikovaným případům za rok (tab. 1, obr. 1) (2). Muži vykazují 1,3-krát vyšší incidenci než ženy, avšak hodnota incidence u nich stagnuje, respektive mírně klesá, zatímco vzestupný trend u žen trvá. Tento trend je vysvětlován zvyšujícím se zastoupením žen–kuřaček v populaci a očekává se, že díky němu se rozdíly ve výskytu onemocnění mezi

Obr. 1: Grafické znázornění růstu hrubé incidence nádorů slinivky břišní na území dnešní České republiky v druhé polovině 20. století (absolutní data a komentář viz tab. 1)



Tab. 1: Vývoj incidence karcinomu pankreatu v České republice (resp. ČSR) v letech 1956–2005 podle pohlaví.

	Muži		Ženy	
	absolutní incidence	hrubá incidence	absolutní incidence	hrubá incidence
1959	186	3.97	173	3.51
1960	271	5.76	210	4.24
1961	264	5.69	202	4.08
1962	285	6.12	226	4.56
1963	346	7.38	254	5.10
1964	351	7.44	250	4.99
1965	345	7.29	264	5.26
1966	397	8.33	272	5.38
1967	431	9.02	339	6.68
1968	413	8.26	316	6.21
1969	434	9.04	351	6.89
1970	469	9.72	307	6.01
1971	439	9.2	338	6.7
1972	463	9.7	428	8.4
1973	445	9.2	385	7.5
1974	538	11.1	425	8.3
1975	573	11.0	453	8.7
1976	515	10.5	399	7.6
1977	530	10.7	426	8.1
1978	547	11.0	485	9.2
1979	571	11.4	488	9.2
1980	570	11.4	470	8.8
1981	586	11.7	523	9.9
1982	614	12.3	482	9.1
1983	605	12.1	481	9.0
1984	695	13.9	512	9.6
1985	636	12.7	549	10.3
1986	642	12.8	542	10.2
1987	719	14.3	599	11.3
1988	649	12.9	545	10.2
1989	721	14.3	638	12.0
1990	786	15.6	643	12.1
1991	746	14.9	694	13.1
1992	775	15.5	679	12.8
1993	766	15.3	709	13.3
1994	748	14.9	739	13.9
1995	708	14.1	692	13.0
1996	806	16.1	750	14.1
1997	803	16.0	787	14.9
1998	803	16.0	797	15.1
1999	751	15.0	740	14.0
2000	800	16.0	772	14.6
2001	784	15.7	796	15.2
2002	857	17.3	806	15.4
2003	876	17.6	820	15.7
2004	847	17.0	805	15.4
2005	901	18.1	876	16.7

Absolutní incidence udává počet nově hlášených diagnóz v příslušném roce; hrubá incidence vyjadřuje absolutní incidenci vztaženou na 100.000 osob (mužů, resp. žen) ve sledované populaci v daném roce.

Poznámka: Údaje z let předcházejících vzniku Národního onkologického registru (1976) je třeba interpretovat jako podhodnocené.

oběma pohlavími prospektivně vyrovnají. V roce 1998 dokonce počet úmrtí na sledovanou diagnózu v české ženské populaci převýšil týž ukazatel v populaci mužské, a tento jev byl znovu potvrzen v následujících letech. Poslední zveřejněné údaje jsou z roku 2005, kdy na pojednávanou diagnózu zemřelo 935 mužů a 873 žen.

Mortalita

Karcinom pankreatu je čtvrtou nejčastější příčinou smrti na nádorové onemocnění v USA (po bronchogenním karcinomu, nádorech prostaty u mužů a prsu u žen a kolorektálním karcinomu) (3), v ČR se v mortalitě na nádorová onemocnění dlouhodobě řadil na páté místo za nádory plic, tlustého střeva a konečníku, prsu a žaludku; v roce 2000 se ve statistikách poprvé umístil na čtvrtém místě před karcinomem žaludku (viz tab. 2). Mortalita na zhoubné

Tab. 2: Nejčastější příčiny úmrtí na nádorová onemocnění v ČR v roce 2000 (absolutní hodnoty).

	muži	ženy	celkem
1.	plíce 4467	prs 1939	plíce 5706
2.	KRCA 2474	KRCA 1862	KRCA 4336
3.	prostata 1327	plíce 1242	prs 1957
4.	žaludek 905	pankreas 789	pankreas 1566
5.	pankreas 777	ovarium 719	žaludek 1565

Zdroj: Novotvary 2000 ČR. Zdravotnická statistika. ÚZIS, Praha, 2004.

novotvary slinivky břišní je téměř identická s jejich incidencí; letalita této diagnózy je vyšší než u jakéhokoliv jiného onkologického onemocnění. Prognostické odhady ve Spojených státech předpokládají v roce 2003 30.700 nových případů (z toho 14.900 u mužů a 15.800 u žen) a 30.000 úmrtí (z toho 14.700 u mužů a 15.300 u žen). Ačkoliv nově diagnostikované případy činí jen 2 % ze všech hlášených onemocnění novotvary za rok, představují zemřelí muži s karcinomem pankreatu 5 % a ženy 6 % všech nádorových úmrtí. V průběhu

devadesátých let minulého století došlo v USA k poklesu úmrtnosti na nádory pankreatu, prognóza však zůstává i nadále infaustní. Pěti let od stanovení diagnózy se dožívají jen 4 % nemocných, respektive 17 % s tumorem ohraničeným na vlastní pankreatickou tkáň, 7 % s lokálně pokročilým nálezem a méně než 1% s diseminovaným onemocněním. Přitom jen 8 % případů je diagnostikováno v lokalizovaném stádiu, 25–26 % v lokálně pokročilém a 46–50 % v diseminovaném stádiu (3). Průměrná délka života od určení diagnózy se u neoperovaných nemocných nebo nemocných po paliativních resekčních výkonech udává v rozmezí 4 až 6 měsíců, po resekčních výkonech 11 až 18 měsíců. Medián rekurence po resekčním výkonu je 8 až 9 měsíců (4).

Věková závislost

Věk je nejsilnějším rizikovým faktorem pro vznik zhoubného novotvaru pankreatu. Onemocnění je raritní v prvních třech dekádách života, poté jeho incidence prudce narůstá a dosahuje maxima v sedmé a osmé životní dekádě. Díky této závislosti lze v naší republice očekávat další nárůst jeho incidence v závislosti na prodlužování střední délky života české populace. Střední věk při stanovení diagnózy činí 65 let, 80 % diagnostikovaných dosáhlo věku 60 a více let. Kumulativní riziko onemocnění karcinomem pankreatu pro osobu završivší 75. rok života činí až 1 % (5). Manifestace onemocnění v mladším věku s sebou vždy nese podezření na primární genetickou příčinu (viz dále).

Rasová specifika

Nejvyšší incidence karcinomu slinivky břišní byla identifikována u Afroameričanů v USA, obyvatel severní Evropy, Polynésanů na Havaji a Maorů na Novém Zélandu. Mortalita v americké černošské populaci je 1,4-krát vyšší než u tamní bělošské populace (muži 16,2 contra 12,0; ženy 13,0 contra 9,0 – vše na 100.000 členů příslušné skupiny). K vyššímu

výskytu onemocnění u afroamerických mužů přispívá silnější kuřáctví, dlouhodobější anamnéza diabetu a rodinná zátěž zhoubným onemocněním slinivky břišní; u žen jsou příčiny spatřovány v četněji se vyskytujícím středně těžkém až těžkém abusu alkoholu a enormním zastoupením osob se zvýšeným BMI (6). Studována je také hypotéza rasově podmíněných odlišností ve schopnosti detoxifikovat kancerogeny z cigaretového kouře. U Afroameričanů byl dále popsán signifikantně vyšší výskyt mutací v onkogenu KRAS než u bělošské populace, častější exprese onkogenu HER2 a postižení okrajů chirurgických resektátů; méně často navíc splňovali indikační kritéria k zahájení radiační léčby, popřípadě chemoterapie (7).

V asiatské ženské populaci v USA je medián přežití od stanovení diagnózy malignity pankreatu vyšší oproti ženské populaci bělošské a černošské. Popsaný jev souvisí s četnějším zastoupením méně agresivních forem karcinomu pankreatu – papilárního karcinomu a mucinózního cystadenokarcinomu – u Asiatů obecně. Doba přežití u nemocných s těmito variantami nádoru je 3 až 4-krát delší než u pacientů s adenokarcinomem (8).

Specifické epidemiologické údaje popisují také maorskou populaci na Novém Zélandu. Incidence nádorů pankreatu v ní činí 7,3 / 100. 000, což významně převyšuje výskyt onemocnění v tamní populaci pacifické (6,4 / 100.000) i evropské (5,6 / 100.000), a nevykazuje očekávanou predominanci v mužské populaci (9).

1.2. RIZIKOVÉ FAKTORY

1.2.1. Faktory zevního prostředí

Kouření

Kouření cigaret je nejsilnějším a zároveň nejsnadněji ovlivnitelným rizikovým faktorem karcinomu pankreatu. Možný mechanismus působení tabákového kouře je vysvětlován orgánově specifickým efektem tabákových N–nitrosaminů nebo sekrecí těchto sloučenin do žluče a jejich refluxem do pankreatického vývodu (10). Aktivní kuřáctví je spojováno s dvoj až trojnásobným zvýšením rizika vzniku malignity slinivky břišní. U mužů s minimálně 35-letou anamnézou kouření dvaceti cigaret denně bylo oproti nekuřákům popsáno relativní riziko onemocnění 1,46; stejně silné kuřačky mají po 23 letech relativní riziko zvýšené na 1,84 (11). Karcinogenní efekt zplodin cigaretového kouře na tkáň pankreatu u exkuřáků pomíjí až po patnáctileté abstinenci (12). Zdravotnická politika zaměřená na potlačování kouření jako negativního sociálního jevu zůstává hlavní náplní primárně preventivních programů v boji s rostoucí incidencí tohoto onemocnění.

Alkohol

Řada epidemiologických studií pátrala po možné souvislosti mezi konzumací alkoholu a vyšší náchylností k rozvoji karcinomu pankreatu. Dvě velké retrospektivní studie provedené ve Spojených státech, které analyzovaly kohorty o celkem 1,9 milionu osob, nepotvrdily asociaci mezi pitím alkoholu a vyšším rizikem pro vznik nádoru slinivky břišní (13). Stejně byly uzavřeny i další tři projekty publikované od roku 2000 – kanadský, japonský a americký – sledující tutéž hypotetickou souvislost (11, 14, 15). Pokud je mírné zvýšení rizika popisováno, lze je přičíst efektu koincidentního kuřáctví (16). Je tedy možné tvrdit, že souvislost mezi

požíváním alkoholu a vznikem karcinomu pankreatu je pouze zprostředkovaná: alkohol je známým indukorem chronické pankreatitidy, která je uznávána jako samostatný rizikový faktor pro vznik malignity. Konzumace alkoholu v míře, která nepoškozuje pankreatickou tkáň, tedy nemá vliv na zvýšení náchylnosti k onemocnění karcinomem pankreatu.

Dietetické faktory

Hodnocení vlivu dietetických faktorů na výši rizika vzniku rakoviny pankreatu je metodicky velmi problematické a údaje získané formou dotazníkových studií mají nízkou exaktní relevanci. Přesto četné studie popisují pozitivní asociaci výskytu nádorů pankreatu s vysokoenergetickou dietou, nadměrným příjmem masa, cholesterolu a smažených pokrmů. Bohaté zastoupení zeleniny, ovoce, vlákniny, vitamínu C a dalších přirozených antioxidantů naopak působí protektivně. Byla publikována studie identifikující vyšší riziko malignity slinivky břišní u osob, které udávají současně zvýšený BMI a nadměrný kalorický příjem, zatímco u individuů se zvýšením jen jednoho ze jmenovaných faktorů, se riziko pohybovalo kolem populačního průměru (15). Zajímavá je hypotéza, která vysvětluje rostoucí incidenci karcinomu pankreatu vyšší spotřebou N-6 polynenasycených tuků rostlinného původu (17). Tyto tuky mají největší vliv na sekreci cholecystokininu, jež je u zvířecích modelů považován za promotor karcinogeneze (18). Naopak N-3 nenasycené mastné kyseliny vykazují protektivní efekt (19). Podobně i poživatiny bohaté na faktory ovlivňující nabídku methylových skupin, např. foláty, vykazují protektivní vliv (20). Souvislost s konzumací kávy prokázána nebyla; konzumace tří a méně šálků černé kávy denně zvýšení rizika pro vznik karcinomu slinivky břišní nepředstavuje (13, 14).

Obezita a fyzická aktivita

Studium obezity jako potenciálního rizikového faktoru pro vznik karcinomu slinivky břišní je ovlivněno faktem, že toto onemocnění se manifestuje dramatickým váhovým úbytkem, a tudíž hmotnost pacienta při stanovení diagnózy je irelevantní. Proto je třeba hodnotit obezitu výhradně prospektivními metodami, tedy před vznikem vlastního onemocnění. Dle výsledků dvou prospektivních korespondenčních studií, do nichž bylo zařazeno přes 163 000 osob, které byly sledovány 10–20 let, měli jedinci s BMI 30 kg/m² a více 1,72-krát vyšší relativní riziko oproti skupině s BMI pod 23 kg/m². Míra fyzické aktivity neměla vliv na výši rizika u individuí s BMI pod 25 kg/m², byla však nepřímo úměrná riziku u osob s BMI 25 kg/m² a vyšším (relativní riziko 0,59). Obezita tedy signifikantně zvyšuje riziko onemocnění malignitou pankreatu, fyzická aktivita je snižuje u osob s nadváhou (21). Je pravděpodobné, že obezita jako stav disponující k insulinorezistenci, přispívá ke genezi tumorů pankreatu stejným mechanismem jako diabetes a snížená glukózová tolerance. Fyzická aktivita glukózovou toleranci zvyšuje, čímž lze vysvětlit její protektivní vliv na míru rizika u obézních pacientů.

Profesionální vlivy

Přestože se uvažuje o expozici polycyklickým uhlovodíkům, aromatickým a heterocyklickým aminům a chlorovaným nepolárním rozpouštědlům jako o riziku pro rozvoj nádorů slinivky břišní, zůstává úloha těchto sloučenin v kancerogenezi tumorů pankreatu sporná. Metaanalýza prací zabývajících se vlivy pracovního prostředí na sledované riziko nepotvrdila statisticky závažné navýšení rizika vzniku karcinomu pankreatu u pracovníků exponovaných účinku chlorovaných uhlovodíků (22). Naopak negativní vliv kadmia byl prokázán. Tento stopový kov se ve vyšších koncentracích kumuluje v pankreatické tkáni, kde dosud neznámým mechanismem facilituje neoplastické procesy. Vyšší expozicí kadmiu lze alespoň částečně

vysvětlit četnější incidenci nádorů pankreatu u pracovníků v metalurgii, při opracování kovů, práci s pesticidy, ale také navýšené relativní riziko u osob vyššího věku, kuřáků nebo rezidentů některých geografických oblastí (23). Dalším kovem suspektním z kancerogenního účinku na tkáň slinivky břišní je chrom; v zásadě se však při profesionální expozici jedná jen o malé navýšení relativního rizika, podobně jako v případě dříve pojednaných látek.

Radiace

U osob vystavených účinkům radioaktivního záření při výbuších atomových bomb v Hirošimě a Nagasaki nebo při haváriích v atomových elektrárnách nebyl popsán nárůst v incidenci karcinomu pankreatu oproti neexponované populaci. Podobně i gynekologická radioterapie jako léčebná metoda riziko vzniku novotvarů slinivky nezvyšuje (24).

1.2.2. Endogenní faktory

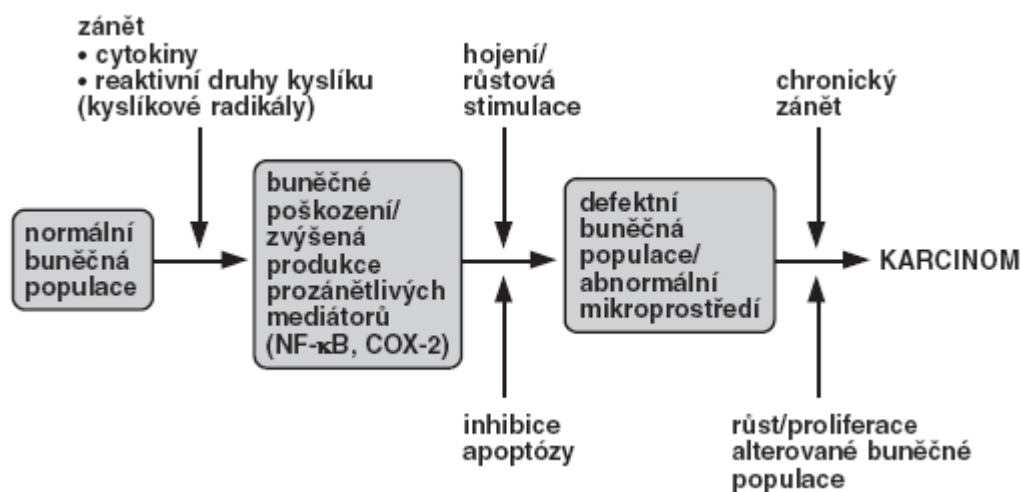
Chronická pankreatitida

Akutní a chronický zánět slinivky břišní jsou v současnosti považovány za dvě patogeneticky odlišná onemocnění a také jejich vztah ke genezi nádorů pankreatu je zcela rozdílný. Zatímco akutní pankreatitida není považována za rizikový faktor stran uvažované onkologické diagnózy, je všeobecně přijímán koncept kauzální asociace mezi alkoholickou, hyperkalcemickou, tropickou i hereditární formou chronické pankreatitidy a zvýšenou dispozicí pro rozvoj karcinomu pankreatu. Obstrukční typ chronické pankreatitidy bývá jako rizikový faktor některými autory zpochybňován.

Ačkoliv jen méně než 5 % diagnostikovaných zhoubných novotvarů slinivky může být vysvětleno rekurentními atakami chronické pankreatitidy, byly tytéž genetické změny detekovány v terénu chronického zánětu i karcinomu slinivky břišní. Předpokládá se, že

chronický zánět indukuje genetické změny v tkáni a současně probíhající hojivý proces vystavuje defektní buňky růstovým faktorům, čímž vzniká abnormální mikroprostředí, ve kterém stromální elementy facilitují neoplastický proces v buňkách epitelu (tzv. „pěstitelská teorie“, obr. 2). Za buněčné efekty zánětlivé odpovědi jsou označovány aktivované makrofágy, jejichž produkty – zejména cytokiny TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, EGF, PDGF, TGF- α a TGF- β – navozují buněčnou proliferaci, angiogenezi i desmoplastickou reakci, jež jsou součástí patogeneze chronické pankreatitidy i karcinomu slinivky břišní. IL-6 podporuje vyžrávání myeloidních prekurzorů v makrofágy, TGF- α inhibuje procesy vedoucí k apoptóze a stimuluje progresivní fibrózu. Tým cytokin dále aktivuje transkripční faktor NF- κ B, který je jedním z mediátorů inhibice programované buněčné smrti a jehož exprese byla popsána v terénu chronického zánětu i karcinomu slinivky břišní. Zvýšená exprese NF- κ B dále stimuluje tvorbu reaktivních forem oxidů dusíku a cyklooxygenázy-2 a indukuje expresi IL-8. Byl popsán autokrinní růstově stimulační efekt IL-8, který je zvýšeně produkován jako odpověď na hypoxii, zejména v centru nádorových ložisek, a který tak působí prokarcinogenně a prometastaticky. Isoforma cyklooxygenázy COX-2 odpovídá za zvýšenou produkci prozánětlivých prostaglandinů v terénu zánětu i karcinomu, facilituje buněčnou proliferaci i angiogenezi a je silným inhibitorem apoptózy. Dále působí při přeměně chemických kancerogenů na jejich mutagenní deriváty, a touto schopností se účastní na eskalaci rizika vzniku karcinomu pankreatu u kuřáků. Imunohistochemické pokusy prokázaly, že exprese COX-2 je vázána na buňky pankreatických ostrůvků, zvýšená exprese tohoto enzymu tudíž značí jejich zánět. Jedna z hypotéz popisujících vznik karcinomu pankreatu staví na klíčovém vztahu mezi zánětem ostrůvků, inzulinovou rezistencí, růstovou stimulací a diabetem. Dalšími produkty aktivovaných makrofágů a neutrofilních granulocytů v terénu zánětu i zhoubného bujení slinivky břišní jsou reaktivní formy kyslíku a oxidů dusíku, jejichž přítomnost je v příčinné souvislosti se strukturními defekty DNA (25, 26).

Obr. 2: »Pěstitelská teorie« progrese chronické pankreatitidy do karcinomu slinivky břišní.



Chronický zánět indukuje genetické změny v tkáni a současně probíhající hojivý proces vystavuje defektní buňky růstovým působkům. Vzniká tak abnormální mikroprostředí, ve kterém buňky stromatu svými produkty »pěstují« defektní populaci epiteliálních buněk, a tím usnadňují jejich transformaci do buněk nádorových

Riziko onemocnění karcinomem slinivky břišní je u osob s chronickou pankreatitidou zvýšeno až 16-krát oproti zdravé populaci (27). Italská studie proklamuje u nemocných s chronickým zánětem slinivky břišní zvýšenou incidenci jak extrapancreatických tumorů (relativní riziko 1,5), tak pankreatických malignit (relativní riziko 18,5). Považovala-li se za relevantní jen onemocnění vzniklá po čtyřech letech trvání chronického zánětu, bylo relativní riziko zvýšené 15,6-krát pro kuřáky, zatímco u nekuřáků nárůst rizika pozorován nebyl (28). Prospektivní studie francouzského onkologického registru, v níž zastoupení chronické pankreatitidy alkoholické etiologie čítalo 85 %, zjistila výši sledovaného rizika 19,0 (29). V české studii, která hodnotila 213 nemocných a karcinom prokázala v 11 případech, dosáhla prevalence zhoubného novotvaru slinivky břišní 5,1 %. Interval mezi stanovením diagnózy chronické pankreatitidy a karcinomu pankreatu činil 6 až 13 let a potvrdilo se, že kumulativní riziko zhoubného onemocnění v terénu chronické pankreatitidy roste lineárně s dobou trvání nemoci – po deseti letech činí 1,8, po dvaceti letech dosahuje již 4,0 (30).

Diabetes mellitus

Problematika vzájemného vztahu diabetu a karcinomu pankreatu byla dlouhodobě zdrojem protichůdných interpretací, kdy na jedné straně byl diabetes chápán jako rizikový faktor pro nádorové onemocnění pankreatu, na druhé straně byl považován za jeho následek ve smyslu pankreatogenního diabetu. Dnes se ukazuje, že vlastním rizikovým faktorem je zvýšená postprandiální glykémie, a tedy snížená glukózová tolerance. Jako promotor pankreatické kancerogeneze je označován produkt β -buněk – inzulin. Nádorové buňky totiž exprimují inzulinové receptory, jejichž aktivace může stimulovat mitózu. Riziko vzniku karcinomu slinivky břišní dále pozitivně koreluje s dietním příjmem živočišných produktů, zatímco veganská dieta, která je asociována se sníženou postprandiální sekrecí inzulinu, působí preventivně (31). Z uvedeného vyplývá, že riziko představuje především diabetes mellitus druhého typu. Metaanalýza publikovaná v roce 2001 konstatuje, že pěti a víceleté trvání diabetu dvakrát zvyšuje relativní riziko následného rozvoje karcinomu pankreatu (32).

Stav po gastrektomii

Některé studie popisují zvýšené riziko rozvoje karcinomu pankreatu u osob s anamnézou perniciózní anémie, parciální gastrektomie pro vředovou chorobu a cholecystektomie (33). Pro pacienty podstoupivší parciální gastrektomii se udává úhrnné relativní riziko 1,8, které postupně narůstá na 3,6 ve 35. roce po operaci. Přestože zhoubné onemocnění slinivky břišní i vředová choroba žaludku a duodena sdílejí některé společné rizikové faktory, jako např. kouření, zdá se, že neoplastická transformace pankreatické tkáně je urychlena procesy podmíněnými samotným chirurgickým výkonem (34). Je zřejmé, že pacient, který po chirurgické resekci žaludku nadále kouří, své riziko oproti nekuřákům potencuje.

Cholelitiáza a cholecystektomie

Cholelitiáza ani cholecystektomie nejsou v současnosti uznávány jako samostatné rizikové faktory pro vznik nádorů pankreatu (35), i když se v odborném tisku stále objevují nové studie popisující vyšší relativní riziko u osob s anamnézou cholelitiázy nebo cholecystitidy (14). Příčiny popsané diskrepance je třeba spatřovat ve vyšším věku jako společném rizikovém faktoru pro vznik žlučových konkrementů i karcinomu slinivky břišní a nedocení této souvislosti některými autory. Dvě recentní retrospektivní studie ukázaly, že cholecystektomie provedená v průběhu dvou let před stanovením diagnózy zhoubného novotvaru pankreatu nepředstavovala vyšší riziko pro toto onemocnění (35, 36); cholecystolitiázu diagnostikovanou v tomto časovém intervalu lze interpretovat jako časný symptom vlastního onkologického onemocnění.

Molekulární epidemiologie

Moderní medicína dospěla díky závratnému růstu poznatků molekulární biologie a genetiky k chápání karcinomu pankreatu jako primárně genetického onemocnění. Proces nádorové transformace je morfologicky popsán sekvencí chronické zánětlivé změny–intraepiteliální neoplasie–karcinom; na molekulární úrovni je sledován postupnou akumulací genetických změn v DNA buněk slinivky břišní, jako jsou mutace v kódujících i regulačních genech, změny ploidity, genové amplifikace, strukturální rearrangement, delece nebo ztráta heterozygoty. Kumulativní efekt získaných mutací v onkogenech KRAS (12p12.1) a HER2/neu (17q11.2) a v tumor supresorových genech *p16^{INK4A}/CDKN2A* (9p21), *p53* (17p13.1), *DPC4/SMAD4* (18q21.1) a *BRCA2* (13q12.3) se projeví vznikem nádorového onemocnění. Obecně lze tvrdit, že mutace v onkogenech jsou časnějším jevem v popsaném procesu, zatímco přítomnost genových variací v tumor supresorových genech je identifikována později. Se sporadickým výskytem pojednávaných mutací souvisí i skutečnost,

že řada faktorů zevního prostředí, jako např. kouření, abusus alkoholu nebo expozice chlorovaným uhlovodíkům, je asociována s vyšší frekvencí mutací v onkogenu KRAS (37). Aktivace tohoto onkogenu je značně specifická pro onkologické pacienty; je popisována až u 90 % osob s adenokarcinomem pankreatu, zatímco jeho pozitivita v tkáni chronické pankreatitidy dosahuje jen 10 %. Podrobněji je problematika genových variací v kancerogenezi tumorů pankreatu pojednána v následující kapitole.

Familiární heredita

Dědičnými faktory lze vysvětlit přibližně 5 % zhoubných nádorů pankreatu. Pokud zohledníme heterogenitu těchto faktorů a neúplnou penetranci zárodečných mutací, incidence podmíněná dědičnými faktory by však tento odhad značně převýšila (38, 39). Karcinom pankreatu byl popsán v rámci celé řady hereditárních chorob a syndromů, jako např. cystická fibróza, hereditární pankreatitida (viz dále), hereditární nepolypózní kolorektální karcinom, familiární adenomatózní polypóza, Li-Fraumeniho syndrom, Peutz-Jeghersův syndrom, syndrom atypického familiárního mnohočetného melanomu a syndrom ataxia-teleangiectasia. K premaligním stavům s rodinným výskytem jsou dále řazeny endokrinní malignity postihující pankreas, jako např. Recklinghausenova choroba a syndrom mnohočetné endokrinní neoplasie typu 1 (40). Samostatnou nosologickou jednotkou je syndrom familiárního karcinomu pankreatu s incidencí zhoubného nádoru slinivky břišní u příbuzných prvního stupně 76 / 100.000. V rodinách s postižením tří a více členů incidence karcinomu narůstá na 301 / 100.000 (41). Nově byl popsán familiární syndrom s dosud neidentifikovaným genovým lokusem sdružující projevy pankreatitidy, diabetu a karcinomu slinivky břišní (42). Jako nejčastější vrozená dispozice k malignímu onemocnění pankreatu byly identifikovány zárodečné mutace v tumor supresorovém genu BRCA2. Studie analyzující více než tři a půl tisícový soubor pacientů s genetickou alterací BRCA2 nebo

mnohočetným výskytem tumorů prsu či ovaria v rodině identifikovala 3,5-krát větší riziko pro vznik karcinomu pankreatu oproti standardní populaci (43).

Hereditární pankreatitida

Hereditární pankreatitida se řadí, obdobně jako cystická onemocnění pankreatu, mezi prekancerózy. Je dnes považována za samostatnou nosologickou jednotku, která představuje 1 až 2 % ze všech zánětlivých onemocnění slinivky břišní. Jedná se o autosomálně dominantně vázané onemocnění s 80% penetrancí podmíněné defektem genu pro trypsinogen, který je lokalizován na chromosomu 7q35. Nemocní s touto genovou lézí mají oproti běžné populaci riziko vzniku karcinomu pankreatu zvýšené 40 až 60-krát. Zajímavostí je, že choroba vykazuje epigenetické rysy dědičnosti: relativní riziko dosahuje až 70 %, pochází-li mutovaná alela od otce (44). U kuřáků s hereditární pankreatitidou byl popsán až o dvě dekády časnější nástup nádorového onemocnění než u stejně disponovaných nekuřáků (45).

Hormonální vlivy

Pohlavní difference v incidenci karcinomu pankreatu vedly ke studiu možných vztahů s gynekologickou anamnézou nemocných žen. V retrospektivních studiích byla potvrzena částečná estrogenová dependence pojednávaného onemocnění. Parita a délka hormonální expozice byly negativně asociovány s mírou rizika pro vznik karcinomu pankreatu. Zjištění je statisticky signifikantní u žen se třemi a více donošenými těhotenstvími a u uživatelů perorálních kontraceptiv. Postmenopauzální hormonální substituce riziko neovlivňuje. Naopak nárůst rizika byl pozorován u rodiček s vyšším věkem prvního donošeného těhotenství (46).

1.3. MOLEKULÁRNÍ GENETIKA

Karcinom pankreatu je geneticky podmíněné onemocnění. Jeho vznik je provázen sekvenční akumulací řady genových mutací, které dávají potenciální nádorové buňce selekční výhodu. V klonu takto determinovaných buněk pak dochází k dalším genovým variacím, až vznikne invazivní maligní fenotyp. Časná stádia v procesu kancerogeneze jsou charakterizována aktivací onkogenů a ztrátou funkce jednoho nebo více tumor supresorových genů mutacemi nebo alelickými delecemi. Pro karcinom pankreatu je typické, že mutace v onkogenu KRAS časově předchází dalším genovým variacím.

Většina maligních tumorů vykazuje monoklonální původ. V proliferačně vysoce aktivních lézích dochází k akumulaci mutací simultánně a nezávisle v řadě buněk; vznikají tak subklony s odlišným mutačním profilem. Ačkoliv jeden klon se v procesu kancerogeneze stane majoritním, zůstává vysoká genetická heterogenita jednou ze specifik karcinomu pankreatu a je jedním z biologických faktorů podmiňujících extrémní rezistenci na léčbu a špatnou prognózu onemocnění.

K akumulaci somatických mutací v genech regulujících buněčný cyklus přispívají i mutace v genech nádorových oprav («mismatch repair genes», MMR). Jejich proteinové produkty opravují chyby vzniklé v řetězci DNA při její replikaci. Defekty těchto genů jsou často provázeny mikrosatelitovou nestabilitou, která se projevuje zvýšením nebo snížením počtu repetitivních sekvencí (mikrosatelitů) při replikaci. K somatické inaktivaci MMR genů dochází často hypermethylací promotorvé oblasti. MMR geny studované u karcinomu pankreatu jsou: MLH1, MSH2 a MSH6.

Až v 95 % vzorků karcinomu pankreatu byla zaznamenána aktivita enzymu telomerázy, který je zodpovědný za de novo syntézu repetitivních sekvencí TTAGGG a stabilizaci chromosomálních konců. Tento nález je specifický pro maligní léze, nebyl

zaznamenán v tkáni normální slinivky břišní ani chronické pankreatitidy. Zvýšená aktivita telomerázy je pozorována až ve fázi invazivního karcinomu a její detekce v pankreatické šťávě nebo v brushingu z pankreatických vývodů je potenciálně využitelná jako doplňkový diagnostický test.

Genová exprese u maligních onemocnění může být zásadně ovlivněna řadou epigenetických změn, jako metylací DNA, potranskripční modifikací histonů nebo změnami v profilu mikroRNA. U karcinomu pankreatu byla podrobněji studována role hypermetylace v inaktivaci tumor supresorového genu *p16*. Recentně byly metodou metylačně-specifické PCR identifikovány další geny, jejichž exprese je ovlivněná stupněm metylace: APC, TSLC/IGSF4, SOCS-1, cyklin D2, RASSF1A, RUNX3 a další.

S rozvojem proteomiky a transkriptomiky je v současnosti objevována řada dosud neznámých genů, které jsou aberantně exprimovány v nádorové tkáni pankreatu a jejichž funkce je zatím neznámá.

1.3.1. Genetické změny v onkogenních signálních drahách

KRAS

Onkogen KRAS (Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogen) je lokalizován na 12. chromosomu v pozici 12p12.1. Jeho aktivující mutace jsou popisovány v 75–90 % případů invazivního karcinomu pankreatu (47). Nejčastěji jsou lokalizovány v kodonu 12, postihují však i kodony 13 a 61. Přítomnost konkrétních mutací onkogenu KRAS, nejčastěji bodových substitucí, vykazuje geografické rozdíly; nejčastější je záměna glycinu za aspartát (GAT, 50 %), valin (GTT, 30 %), arginin (CGT, 11 %) a cystein (TGT, 6 %).

Ras je malý membránový protein o velikosti 21 kDa, má GTP-vážící doménu a uplatňuje se v kaskádě přenosu signálu do jádra buňky iniciované vazbou růstového faktoru.

Má zásadní úlohu v regulaci buněčné proliferace a diferenciaci. Mutace vedou ke vzniku konstitutivně aktivní formy proteinu Ras, kdy nedochází k uvolnění GTP z vazby. Výsledkem je trvalá růstová stimulace buňky (48). KRAS mutace se často vyskytují v benigních lézích pankreatu i v časných prekurzorových stádiích (PanIN-1A).

Protein Ras může být potranslačně modifikován farnesyací C-terminálního konce. Tento krok je řízen enzymem farnesyl transferázou, jehož inhibitory jsou v současnosti testovány v klinické praxi (49).

Kromě přímé modifikace funkce Ras proteinu byly terapeuticky cíleny i procesy přenosu signálu v některých kaskádách, které mutace onkogenu KRAS spouští. Jednou z nich je kaskáda proteinů Raf-Mek-Erk. Proběhlé studie s použitím sorafenibu, inhibitoru Raf-1 kinázy a receptoru pro endoteliální růstový faktor, však u pokročilého karcinomu pankreatu neprokázaly terapeutický efekt (50).

Růstové faktory a jejich receptory

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR, HER-1) je transmembránový glykoprotein, který se skládá z extracelulární na cystein bohaté domény pro vazbu ligandu, hydrofobní transmembránové domény a intracelulární domény s tyrozinkinázovou aktivitou. Oba jeho hlavní ligandy, epidermální růstový faktor (EGF) a transformující růstový faktor α (TGF- α), jsou zvýšeně exprimovány u karcinomu pankreatu (51). Vazba ligandu vede k homo- či heterodimerizaci receptoru s dalšími členy rodiny receptorových kináz ErbB (např. HER-2/neu). Následuje fosforylace tyrosinových zbytků v kinázové doméně receptoru, které pak aktivují intracelulární přenašeče signálu. K signálním drahám, které jsou u karcinomu pankreatu aktivovány cestou přes EGFR, patří: Ras-Raf- Mek (přenos růstových signálů), PI3K-Akt (přenos signálů pro progresi buněčného cyklu a rezistenci k apoptóze) a Jak-STAT

(stimulace buněčného dělení, motility, invazivního růstu a regulace exprese adhezivních molekul) (52).

EGFR-1 představuje slibný cíl pro biologickou léčbu karcinomu pankreatu. Dosud byly v klinické praxi zkoušeny dvě látky: cetuximab, chimerická monoklonální protilátka proti extracelulární doméně EGFR, způsobující internalizaci receptoru a jeho degradaci, a erlotinib, inhibující tyrozinovou kinázu receptoru vazbou k intracelulární doméně EGFR. Obě látky v kombinaci s gemcitabinem vykazovaly ve studiích fáze III signifikantně lepší celkové přežití než při terapii samotným gemcitabinem (53).

Mezi další receptory růstových faktorů, které jsou zvýšeně exprimovány v karcinomu pankreatu, a představují tudíž potenciální cíle biologické léčby, patří receptor pro insulinu podobný růstový faktor (IGFR-1), receptory pro fibroblastový růstový faktor, vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR) (54). Výsledky studií užívajících monoklonální protilátku proti VEGFR bevacizumab v kombinaci s gemcitabinem jsou rozporuplné (55,56).

EGFR-2 je produktem onkogenu HER-2/neu, lokalizovaném na 17. chromosomu v poloze 17q21.1. Jeho zvýšená exprese, ve vysoké míře detekovaná již v časných stádiích PanIN-1 (>80 %), je důsledkem zvýšené transkripce spíše než genové amplifikace (57). Terapeuticky zatím ovlivňován nebyl.

1.3.2. Genetické změny v signálních drahách ovlivňovaných tumor supresorovými geny

Tumor supresorové geny kódují proteiny, jež vykonávají dozorčí úlohu v průběhu buněčné proliferace. K základním mechanismům, kterými tuto funkci vykonávají, patří kontrola progresu buněčného cyklu, regulace transkripce, iniciace apoptózy, ovlivňování funkcí cytoskeletu a signálními drahami mediovaná suprese buněčného růstu. Ve sporadickém karcinomu pankreatu bývají nejčastěji inaktivovány geny *p53*, *p16* a *DPC4*. Inaktivace genů

p53 a *p16* je popisována v řadě dalších maligních onemocnění, pro karcinom pankreatu je typická současná inaktivace několika tumor supresorových genů současně. Rozenblum publikoval současnou inaktivaci všech tří výše jmenovaných genů v 37 ze 40 analyzovaných vzorků karcinomu pankreatu (58). V jednom případě zaznamenal vrozenou mutaci genu BRCA2 a 8 dalších získaných mutací. Další charakteristickou typickou pro karcinom pankreatu je častá přítomnost homozygotních delecí: 40% v případě genu *p16* a 30% v případě genu DPC4.

Tumor supresorové geny, které jsou nejčastěji inaktivovány v karcinomu pankreatu, jsou: *p16* (inaktivován v 95 % případů), *p53* (50-70 %), DPC4 (55 %), BRCA2 (7 %), MKK4 (4 %), STK11/LKB1 (4 %), ALK (2-4 %) a TGFBR2 (4 %).

p16

Aktivace cyklin dependentních kináz (CDK) vede k aktivaci Rb proteinu, jenž stimuluje transkripci genů regulovaných transkripčním faktorem E2F, a následnému vstupu buňky do syntetické fáze buněčného cyklu (59). Aktivace CDK je zprvu podmíněná mitogenní stimulací (cyklin D dependentní kinázy), posléze se stává na této stimulaci nezávislou (cyklin E dependentní kinázy). Produkt genu *p16^{INK4A}*, protein p16, zasahuje do popsání signálního procesu vazbou k CDK4/CDK6, čímž brání vzniku aktivních komplexů cyklinu D s CDK4 a CDK6. To vede k setrvání Rb proteinu v nefosforylovaném stavu a blokáde vstupu do S fáze buněčného cyklu.

V karcinomu pankreatu dochází k potlačení výše popsané signální dráhy nejčastěji funkční inaktivací *p16^{INK4A}* genu, která byla popsána v 80–95 % invazivních karcinomů a je dávana do příčinné souvislosti s nekontrolovaným růstem nádorových buněk (58). Tumor supresorový gen *p16^{INK4A}* se nachází na 9. chromosomu v pozici 9p21. Jeho inaktivace byla identifikována již v prekurzorových stádiích vývoje karcinomu na rozhraní fází PanIN-1B

a PanIN-2 a dochází k ní buď formou delece obou alel (40 %) nebo mutací jedné alely a současnou ztrátou alely druhé (35–40 %). Ve zbývajících případech je alela inaktivována jiným mechanismem, jako je hypermetylace CpG ostrovů v promotorové oblasti (15 %). Míra metylace je úměrná progredujícímu stádiu onemocnění (60).

p53

Více než 50 % případů karcinomu pankreatu nese mutaci v tumor supresorovém genu *p53* (TP53) (12). Jeho produktem je transkripční faktor p53, jenž se za normálních okolností v buňce vyskytuje v nízkých koncentracích díky interakci s proteinem HDM2 (human homologue of MDM2) a následné degradaci v proteasomu. Vazba mezi p53 a HDM2 je potlačena za podmínek buněčného stresu (např. genotoxické poškození, aktivace onkogenů), což vede ke stabilizaci proteinu p53, vzestupu jeho plazmatických hladin a uplatnění v regulačních procesech (59).

Protein p53 za normálních okolností hraje klíčovou kontrolní úlohu na přechodu mezi G1 a S fázi buněčného cyklu, je silným induktorem programované buněčné smrti nebo může indukovat dočasnou zástavu progresu buněčného cyklu a opravu DNA, čímž zásadně přispívá k udržení genomové stability. Normální protein p53 je schopen reagovat na potenciálně onkogenní stimulaci (např. při poruše DNA) a iniciovat v buňce arest buněčného cyklu, terminální diferenciaci nebo apoptózu. Důsledkem jeho inaktivace je poškození regulačních mechanismů buňky, neschopnost zastavit progresi buněčného cyklu v G1/S fázi, neschopnost navodit apoptózu a genomová instabilita charakterizovaná amplifikací genových sekvencí, aneuploidií nebo delecemi celých chromosomových oblastí.

Gen *p53* je lokalizován na 17. chromosomu v poloze 17p13.1. Jeho inaktivace je pozorována až ve stádiích karcinomu in situ a invazivních forem onemocnění. Příčinou ztráty funkce genu je nejčastěji mutace jedné a následné ztráty druhé alely. Mutace jsou zpravidla

lokalizovány do oblasti kódující konzervativní doménu proteinu p53, jde nejčastěji o nesmyslné («missense») mutace, byly popsány i posuny čtecího rámce. Procento nesmyslných mutací je u genu *p53* vyšší než u jiných tumor supresorových genů, je proto oprávněná hypotéza, že má v procesu karcinogeneze selekční výhodu.

DPC4/SMAD4

DPC4 (deleted in pancreatic carcinoma) byl původně izolován jako tumor supresorový gen specifický pro karcinom pankreatu (61). Ačkoliv jeho mutace v karcinomech obecně časté nejsou, pro karcinom pankreatu jsou genové alterace na 18. chromosomu v lokusu MADH4 (18q21.1), který kóduje Smad4 protein, typické. Ztráta heterozygoty DPC4/SMAD4 genu byla detekována v 90 % karcinomů pankreatu, kompletní absence Smad4 produktu byla zjištěna u 55 % případů (62). V prekursorových lézích je popisována až v pokročilých stádiích (PanIN-3) (63). Ztráta funkčního Smad4 proteinu zásadně ovlivňuje vlastnosti nádorového mikroprostředí a facilituje invazivní růst (64).

Smad4 protein patří do rodiny transkripčních faktorů Smad. Má zásadní úlohu v kaskádě přenosu signálu zprostředkovaným cytokiny z rodiny transformujícího růstového faktoru β (TGF- β) (65). TGF- β ligand za normálních okolností působí antionkogenně vazbou na TGF- β receptor II (TGFB2), která umožní tvorbu heterodimeru TGFB2 s ALK-5 (TGFB1). ALK-5 spouští signální kaskádu Smad proteinů, která vede k translokaci Smad4 do jádra, kde se váže k DNA a aktivuje transkripci řady genů. Smad4 není přímo substrátem TGF- β receptoru, tvoří komplex s dalšími fosforylovanými Smad proteiny a po translokaci do jádra se váže s proteiny, které jsou specifické pro určitý typ buňky a konkrétní podmínky, v nichž se buňka nachází. Tyto partnerské proteiny určují, k jaké sekvenci DNA se komplex Smad proteinů naváže a s jakými koaktivačními či korepresivními molekulami bude interagovat. Smad4 se účastní vazby koaktivačního proteinu p300.CBF. Ztráta jeho funkce

vede k neschopnosti buňky odpovídat na buněčné signály zprostředkované řadou signálních molekul z TGF- β rodiny.

Vysoká exprese TGF- β ligandu i receptoru je pro karcinom pankreatu typická. TGF- β ligandy jsou silnými regulátory nádorového růstu, diferenciaci a migraci. Bylo prokázáno, že po ztrátě produktu DPC4/SMAD4 genu v buněčných liniích nedochází k TGF- β indukované zástavě buněčného cyklu a migraci, schopnost epitel-mesenchymální transdiferenciaci však zůstává zachována (66). Je proto zřejmé, že ztráta Smad4 proteinu vede k potlačení TGF- β zprostředkované nádorové suprese za současného zachování některých TGF- β mediovaných prokancerogenních funkcí.

Imunohistochemické studie prokázaly, že ztráta exprese Smad4 proteinu koreluje s vyšší resekcibilitou a délkou přežití po resekcii, zatímco u pacientů, jejichž tumor exprimuje Smad4, resekcce délku přežití neovlivňuje. Terapeutické postupy ovlivňující TGF- β signalizaci jsou ve vývoji.

1.4. HISTOLOGICKÁ KLASIFIKACE

V pankreatické tkáni člověka rozlišujeme tři epiteliální buněčné linie: buňky vývodů, acinózní buňky a buňky endokrinní. V první skupině se buňky velkých pankreatických vývodů svou schopností produkovat mucin fenotypicky odlišují od buněk vystylajících vývody nižšího řádu, včetně buněk centroacinózních. Buněčný fenotyp různých forem nádorů pankreatu odráží původ v jedné ze tří výše jmenovaných linií. Aktuální WHO klasifikace maligních epitelových nádorů pankreatu z roku 2000 je uvedena v tabulce 3 (67). Skladba konkrétních imunohistologických markerů odpovídá přítomnosti nádorových buněk k duktální, acinózní nebo endokrinní linii (tab. 4).

Tab. 3: Klasifikace maligních epitelových nádorů pankreatu dle WHO

Dysplazie těžkého stupně / karcinom in situ
Duktální adenokarcinom
<ul style="list-style-type: none">• karcinom z buněk pečetního prstene• adenoskvamózní karcinom• pleomorfní (nediferencovaný, anaplastický) karcinom• mucinózní necystický karcinom• smíšený karcinom z duktálních a endokrinních buněk
Karcinom z obrovských buněk (osteoklastický typ)
Serózní cystadenokarcinom
Mucinózní cystadenokarcinom
<ul style="list-style-type: none">• neinvazivní varianta• invazivní varianta
Intraduktální papilární mucinózní nádor
<ul style="list-style-type: none">• neinvazivní varianta• invazivní varianta
Papilární cystický nádor (solidní pseudopapilární karcinom)
Karcinom z acinózních buněk
<ul style="list-style-type: none">• cystadenokarcinom z acinózních buněk• smíšený karcinom z acinózních a endokrinních buněk
Pankreatoblastom
Ostatní nádory

Tab. 4: Diferenciální imunohistologie epiteliálních nádorů pankreatu

Druh nádoru	CK8, CK18	CK7, CK19	CEA	M ₁	TRYP	NSE ^d	SYN ^d	CG ^d	AAT
serózní cystadenom	+	+	–	–	–	–	–	–	–
duktální adenokarcinom	+	+	+	+	–	–	–	–	–
mucinózně cystický karcinom	+	+	+	+	–	–	–	–	–
intraduktální papilární mucinózní nádor	+	+	+	+	–	–	–	–	–
karcinom z acinózních buněk	+	+ ^b	–	–	+	–	–	–	– ^a
pankreatoblastom	+	+	–	–/+	+	–	–	–	–
papilární cystický nádor	– ^a	– ^a	–	–	–	+	–	–	+
endokrinní tumory	+	+ ^c	–	–	–	+	+	+	–

Vysvětlivky: CK – cytokeratin, CEA – karcinoembryonální antigen, M₁ – antigen peptidového jádra mucinu v povrchových foveolárních buňkách žaludku, TRYP – trypsinogen, NSE – neuron specifická enoláza, SYN – synaptofyzin, CG – chromogranin A, AAT – alfa-1-antitrypsin; ^a obvykle negativní; ^b negativní ve 20–30 % případů; ^c většina negativní pro CK 7; ^d fokální pozitivita možná v duktálním adenokarcinomu, mucinózním cystickém karcinomu, intraduktálním papilárním mucinózním karcinomu, karcinomu z acinózních buněk a pankreatoblastomu.

V dalším popisu se omezíme pouze na duktální adenokarcinom, který je předmětem studia předkládaného projektu.

1.4.1. Duktální adenokarcinom

Adenokarcinom z buněk pankreatických vývodů představuje 90 % všech pankreatických malignit. Je nejčastěji lokalizován v hlavě pankreatu, makroskopicky dosahuje velikosti několik centimetrů, má žlutobílou až šedou barvu, je skirhotický. Roste většinou infiltrativně do okolní pankreatické tkáně, prorůstá do duodena a invaduje do mezenterických a slezinných cév. Při lokalizaci v kaudě pankreatu prorůstá do sleziny levé nadledviny, příčného tračníku

a měkkých tkání retroperitonea. Metastazuje především do regionálních lymfatických uzlin (72–84 %), jater (64–80 %), plic (27–50 %) a nadledvin (12–26 %). V pokročilém stadiu onemocnění vzniká karcinomatóza peritonea.

V mikroskopickém obraze se skládá z invazivně rostoucích duktálních a tubulárních struktur zasazených do hojného desmoplastického stromatu. Typické je perineurální šíření. Stupeň diferenciacie se může značně lišit v různých okrscích téhož tumoru. Někdy jsou žlázoové struktury natolik dobře diferencovány, že je lze jen velmi obtížně odlišit od benigních lézí. Mikroskopická podoba buněk duktálního adenokarcinomu pak může nápadně připomínat vývodové epitelie pankreatu: přítomny jsou mikroklyky na luminálním povrchu, granula obsahující mucin jsou nahromaděna v apikální části cytoplasmy a jádra se zřetelným malým jadérkem jsou uložena při bazi (68).

Nádorové buňky zpravidla produkují mucin, jehož fenotyp je blízký mucinu intralobulárních duktulů. Je to zejména přítomnost MUC1 (fyziologický marker intralobulárních duktulů) a chybění MUC2. MUC4 je detekovatelný na nádorových buňkách, ve zdravé pankreatické tkáni však exprimován není (69). Dalšími markery typickými pro duktální adenokarcinom pankreatu jsou cytokeratiny 7, 8, 18 a 19, méně často cytokeratin 20, CA19-9, DUPAN-2, SPan1 a CEA (67,68).

Analýza genových mutací umožňuje odlišit duktální adenokarcinom od dalších typů epitelových nádorů pankreatu stejně jako identifikovat a klasifikovat prekurzorové intraduktální léze (viz dále) (70). Nejčastěji popisované genové variace charakteristické pro karcinom pankreatu jsou: aktivace onkogenu KRAS a inaktivační mutace v tumor supresorových genech $p16^{\text{INK4A}}$ /CDKN2A, $p53$ a DPC4/SMAD4. Frekvence výskytu jednotlivých variací se liší v závislosti na definici cílové skupiny, vyšetřovaném materiálu i použité laboratorní technice; je uvedena v tabulce 5 (71). Aktivita telomerázy byla detekována v 95 % případů. Velmi časté jsou alelické ztráty na chromosomech 9p, 17p a 18q.

Ke genům, jež jsou alterovány s výrazně nižší frekvencí, patří MKK4, gen pro R1 a R2 receptory TGFβ, BRCA2 a LKB1/STK11. Korelace mezi mutacemi v »mismatch repair«

Tab. 5: Frekvence nejčastějších genových variací u karcinomu pankreatu

Mutovaný gen	incidence v karcinomu pankreatu	incidence v chronické pankreatitidě
KRAS	75 – 90 %	0 – 40 %
HER-2/neu	10 – 60 %	15 – 55 %
<i>p16</i> ^{INK4A}	80 – 95 %	0 – 25 %
<i>p53</i>	50 – 75 %	0 – 20 %
DPC4/SMAD4	45 – 55 %	0 – 58 %

genech hMLH1 a hMSH2 a vyšším výskytem karcinomu pankreatu nebyla prokázána. Naopak vrozené mutace BRCA2 genu byly detekovány u 20 % familiárních karcinomů pankreatu.

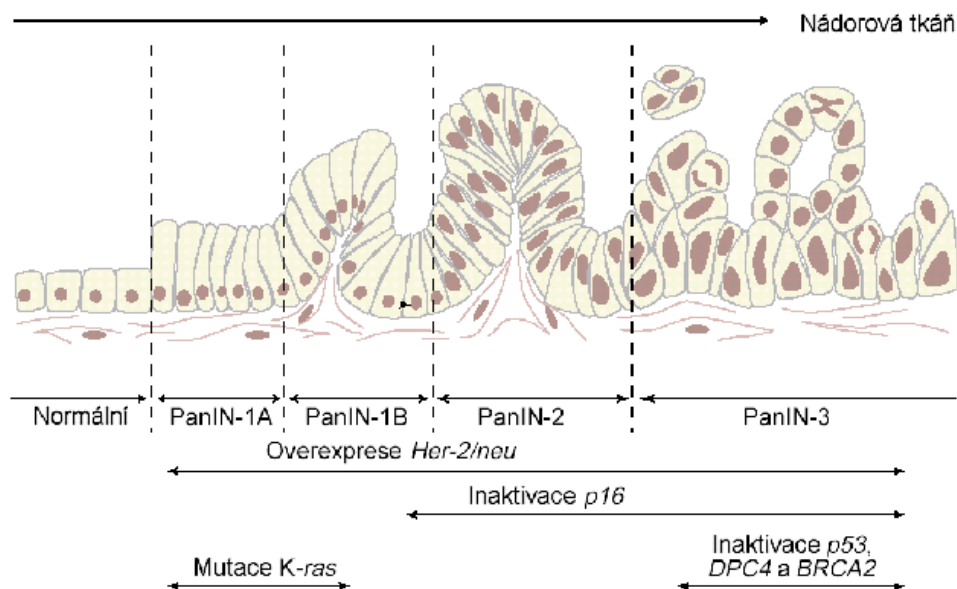
1.4.2. Prekurzorové intraduktální léze

Proces nádorové transformace je morfologicky popsán sekvencí normální epitel – intraepiteliální dysplastické změny – karcinom. Premaligní léze jsou klasifikovány podle konsenzu z roku 1999, který byl publikován v American Journal of Surgical Pathology v roce 2001 (72). Tento systém využívá nomenklaturu pankreatických intraepiteliálních neoplazií (PanIN) navrženou Klimstrou a Longneckerem (73); je založen na histomorfologickém popisu lézí, současně však odráží i jejich klinický korelát a frekvenci molekulárněgenetických alterací (obr. 3). Histopatologický grading konkrétní léze je určen komponentou, která vykazuje nejvyšší stupeň atypie.

- **Normální epitel:** normální duktální a duktulární epitel je kubický až nízcí cylindrický s amfofilní cytoplazmou. Intracytoplazmatický hlen, těsnání jader ani buněčné atypie nejsou přítomny.
- **Skvamózní (přechodní) metaplazie:** během metaplastického procesu jsou normální kubické epitelié vývodů nahrazeny buď zralým vrstevnatým dlaždicovým epitelem, nebo pseudovrstevnatým přechodním epitelem bez buněčných atypií.
- **PanIN-1A (pankreatická intraepiteliální neoplazie 1-A):** ploché epiteliální léze tvořené vysokými cylindrickými buňkami s bazálně uloženými jádry a hojným supranukleárním mucinem. Jádra jsou malá, kulatá až oválná. Oválná jádra jsou orientována kolmo na bazální membránu. V některých případech není možné jednoznačně histologicky odlišit benigní ploché hyperplastické léze od plochých neoplastických lézí bez buněčných atypií. Proto se někdy takto klasifikované jednotky doplňují termínem »léze« (PanIN/L-1A), který implikuje, že neoplastická povaha nálezu není jednoznačně určena.
- **PanIN-1B (pankreatická intraepiteliální neoplazie 1-B):** epiteliální léze s papilární, mikropapilární nebo při bázi pseudostratifikovanou architektonikou, které se jinak neliší od PanIN-1A.
- **PanIN-2 (pankreatická intraepiteliální neoplazie 2):** ploché nebo papilárně uspořádané mucinózní epiteliální léze, které vykazují některé jaderné abnormality: jádra jsou zvětšená, hyperchromní, ztrácejí polaritu a jsou nakupena těsně vedle sebe. Tyto atypie však nedosahují míry popisované v PanIN-3. Mitózy jsou vzácné; pokud jsou přítomny, pak jsou lokalizovány při bázi (nikoliv lumenálně) a nikdy nejsou atypické. Kribriformní struktury s nekrotizací při lumenálním pólu a nápadné cytologické abnormality nejsou pro toto stadium typické a poukazují k diagnóze PanIN-3.
- **PanIN-3 (pankreatická intraepiteliální neoplazie 3):** papilární nebo mikropapilární léze, vzácně však mohou být i ploché. Typické je kribriformní uspořádání, odlučování malých

»pupenů« epitelových buněk do lumen a luminální nekrózy. V cytologickém obraze je popisována ztráta jaderné polarity, četné nukleární atypie a výrazná zvětšená jádérka, jsou přítomny mitózy, které mohou být ojediněle atypické. Dále jsou zastíženy dystrofické pohárkové buňky s jádry orientovanými k luminálnímu pólu a intracelulárním hlenem při bazálním pólu buňky. Na cytonukleární úrovni nález připomíná karcinom, není však přítomna invaze přes bazální membránu.

Obr. 3: Schématické znázornění morfologických a molekulárněgenetických změn v jednotlivých fázích vývoje karcinomu pankreatu.



Výše uvedený systém byl vytvořen pro klasifikaci duktálních lézí, které postihují pankreatické vývody o nižším kalibru (sekundární vývody a menší). Jestliže léze postihuje hlavní pankreatický vývod nebo je detekovatelná makroskopicky či při radiologickém zobrazení, měla by být popsána jako intraduktální papilární mucinózní nádor.

Na molekulární úrovni je sledovaný proces charakterizován postupnou akumulací genetických změn v DNA buněk slinivky břišní: mutacemi v kódujících i regulačních genech, změnami ploidity, genovými amplifikacemi, strukturálním rearrangement, delecemi nebo ztrátou heterozygoty (tab. 6) (74). Obecně lze tvrdit, že mutace v onkogenech se objevují dříve než genové variace v tumor supresorových genech. Aktivovaná forma onkogenu KRAS je detekovatelná již v časném stadiu vývoje karcinomu PanIN-1A, v invazivním karcinomu byla nalezena až v 90 % případů. Podobně i mutace onkogenu HER-2/neu byly zachyceny v lézích s mírnou buněčnou atypii. Z tumor supresorových genů dochází nejdříve k variacím v genu $p16^{INK4A}/CDKN2A$, a to již na rozmezí fází PanIN-1B a PanIN-2. U invazivních karcinomů je tento gen inaktivován až v 95 %. Detekce mutovaných forem genů $p53$ a DPC4/SMAD4 je známkou pokročilého procesu (stadium PanIN-3). Kumulativní efekt popsanych získanych mutací se projeví vznikem nádorového onemocnění.

Tab. 6: Genetické odchylky nalézané v různých stádiích pankreatické intraepiteliální neoplasie (PanIN)

PanIN-1	PanIN-2	PanIN-3
zkracování telomer	cyklin D1	p53
p21 (WAF1/CIP1)	cyklooxygenáza 2 (COX-2)	DPC4 (SMAD4)
HER-2/neu	Hes1	BRCA2
MUC1	Notch 1	S100P
MUC6	pepsinogen C	SHH
TFF1	KLF4	sialyT
$p16^{INK4A}$	HOXA5	maspin
S100A11	GATA5	MUC4
MUC5AC	gastrin	TSLC-1
S100A6	villin-1 a villin-2	FAP
	CRABP1	

Vysvětlivky: HER2/neu = human epidermal growth factor receptor 2; MUC1 = mucin 1; TFF1 = trefoil factor 1; Hes1 = hair and enhancer of split 1; KLF4 = Kruppel-like factor 4; CRABP1 = cellular retinoic acid binding protein 1; sialyT = mucin-associated carbohydrate antigen; TSLC-1 = tumour suppressor in lung cancer 1; FAP = familial adenomatous polyposis

• **Intraduktální papilární mucinózní nádor (IPMN):**

IPMN jsou papilárně uspořádané mucin produkující epitelové nádory, které byly popsány ve škále od benigních adenomů až k invazivnímu karcinomu. Rostou pomalu a asi 30 % malignizuje a zakládá vzdálené metastázy. Podle lokalizace mohou být děleny na IPMN hlavního pankreatického vývodu a IPMN postranních větví. V současnosti jim je věnována velká pozornost jako zřejmým premaligním lézím duktálního adenokarcinomu slinivky břišní.

Na rozdíl od pankreatických intraepiteliálních neoplázií (PanIN lézí) jsou viditelné makroskopicky i na klasických zobrazovacích metodách (CT, ERCP, EUS). Produkce mucinu a intraduktální růst tumoru mohou způsobit cystickou dilataci vývodného systému pankreatu. Dilatace Wirsungova vývodu nad 1 cm budí podezření na IPMN v této lokalizaci, zatímco přítomnost mucinózní cysty komunikující s hlavním pankreatickým vývodem bez jeho dilatace je vysoce suspektní z IPMN postranních větví vývodného systému (75).

Rozlišení mezi IPMN Wirsungova vývodu a IPMN postranních větví vývodného systému pankreatu má i prognostický význam z důvodu odlišného biologického chování: zatímco v první skupině byla progresse do maligního karcinomu popsána v 57–92 %, ve druhé skupině byla zaznamenána jen v 6–46 % (75). Imunohistochemicky lze IPMN rozdělit do tří skupin podle exprese MUC1 a MUC2 proteinů. MUC1⁺/MUC2⁻ varianta je považována za prekursor duktálního adenokarcinomu pankreatu (76).

IPMN se vyskytují o něco častěji u mužů (poměr M : Ž = 1,5 : 1), střední věk činí 64 (35–85) let. V 74 % jsou lokalizovány v oblasti hlavy pankreatu. Klinicky se manifestují nejčastěji projevy akutní nebo chronické pankreatitidy, zbylé jsou incidentalomy. Prognóza je při včasné diagnóze příznivá až v 70 % případů. Pacienty po resekčním výkonu je nutno dlouhodobě sledovat pro možnost výskytu synchronních lézí a až 10% rekurenci tumoru (77).

- **Mucinózní cystický nádor (MCN):**

MCN jsou mucin produkující cystické nádory pankreatu vyskytující se podobně jako IPMN v benigní, hraniční i maligní variantě. Na rozdíl od IPMN však nekomunikují s vývodným systémem pankreatu, a nezpůsobují tudíž jeho dilataci, bývají lokalizovány v oblasti těla a kaudy pankreatu (>90 %) a jsou typické pro ženské pohlaví (poměr Ž : M = 9: 1). Mohou se vyskytovat solitárně i multilokulárně. Velikost cystických ložisek kolísá od 3 do 23 cm. Tekutina z cystické dutiny je bohatá na antigeny CEA a CA 19–9. Střední věk při diagnóze činí 47 (23–78) let.

Histologicky jsou MCN tvořeny epitelovou výstelkou produkující mucin a stromatem nápadně připomínajícím ovariální stroma. Na buňkách stromatu lze imunohistochemicky prokázat přítomnost estrogenového a progesteronového receptoru. Tato skutečnost podporuje hypotézu, že MCN vznikají z reziduí genitální lišty, které vcestovaly do dorzálního listu slinivky během embryonálního vývoje. Vysvětluje se tak predominance MCN v ženské populaci i možnost vzniku tohoto tumoru také u postmenopauzálních žen a u mužů (78).

Přítomnost stromatu ovariálního typu je na základě mezinárodního konsensu z roku 2004 podmínkou pro diagnózu MCN a jeho odlišení od IPMN (75). Rozlišení obou typů má zásadní význam pro kliniku. Zatímco většina MCN se vyskytuje solitárně a po resekci nerekuruje, pacienti po chirurgickém odstranění IPMN profitují z dlouhodobého sledování pro možnost výskytu synchronních lézí a rekurence onemocnění.

Klinicky se MCN manifestují nejčastěji nespecifickými dyspeptickými obtížemi, břišním dyskomfortem, nebo hmatným ložiskem v epigastriu. Ostatní případy jsou klinicky němé. Kompletní resekce MCN je možná ve více než 90 % případů, prognóza je pak výborná. Prevalence invazivního karcinomu kolísá mezi 6 a 27 %. Multilokulární MCN, lokalizace v hlavě pankreatu a přítomnost papilárních výběžků do dutiny tumoru jsou nepřímými znaky invazivity tumoru (78).

LITERATURA

- 1 Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L et al. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1998. National Cancer Institute, Bethesda, MD, 2001.
- 2 Novotvary 2005 ČR. Zdravotnická statistika. ÚZIS, Praha, 2008.
- 3 Cancer Statistics 2003. A Presentation from The American Cancer Society. American Cancer Society Inc., 2003 (<http://www.cancer.org>).
- 4 Zavoral M. Karcinom pankreatu: současný pohled na etiopatogenezu, diagnostiku a léčbu. Vlastní zkušenosti – analýza 148 nemocných. Habilitační práce. 2. LF UK, Praha, 2002.
- 5 Kelsen D, Daly JM, Kern SE, Levin B, Tepper JE. Gastrointestinal Oncology. Principles and Practice. Lippincott W&W, Philadelphia, 2002.
- 6 Silverman DT, Hoover RN, Brown LM, Swanson GM, Schiffman M, Greenberg RS. Why do Black Americans have a higher risk of pancreatic cancer than White Americans? *Epidemiology*. 2003; 14(1): 45-54.
- 7 Pernik NL, Sarkar FH, Philip PA, Arlauskas P, Shields AF, Vaitkevicius VK. Clinicopathologic analysis of pancreatic adenocarcinoma in African Americans and Caucasians. *Pancreas*. 2003; 26(1): 28-32.
- 8 Longnecker DS, Karagas MR, Tosteson TD, Mott LA. Racial differences in pancreatic cancer: comparison of survival and histologic types of pancreatic carcinoma in Asians, blacks, and whites in the United States. *Pancreas*. 2000; 21(4): 338-43.
- 9 Phillips AR, Lawes CM, Cooper GJ, Windsor JA. Ethnic disparity of pancreatic cancer in New Zealand. *Int J Gastrointest Cancer*. 2002; 31(1-3): 137-45.
- 10 Wynder EL. An epidemiological evaluation of the causes of cancer of the pancreas. *Cancer Res*. 1975; 35: 2228-33.
- 11 Villeneuve PJ, Johnson KC, Hanley AJ, Mao Y. Alcohol, tobacco and coffee consumption and the risk of pancreatic cancer: results from the Canadian Enhanced Surveillance System case-control project. *Eur J Cancer Prev*. 2000; (9)1: 49-58.
- 12 Boyle P, Maisonneuve P, de Mesquita BB, Ghardirian P, Howe GR, Zatonski W et al. Cigarette smoking and pancreas cancer: a case control study of the search programme of the IARC. *Int J Cancer*. 1996; 67(1): 63-71.
- 13 Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS. Coffee and alcohol consumption and the risk of pancreatic cancer in two prospective United States cohorts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001; 10(5): 429-37.
- 14 Lin Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y, Kikuchi S, Motohashi Y, Kurosawa M, Ohno Y. Risk of pancreatic cancer in relation to alcohol drinking, coffee consumption and medical history: findings from the Japan collaborative cohort study for evaluation of cancer risk. *Int J Cancer*. 2002; 99(5): 742-6.
- 15 Silverman DT. Risk factors for pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2001; 21(1): 7-25.
- 16 Ye W, Lagergren J, Weiderpass E, Nyren O, Adami HO, Ekblom A. Alcohol abuse and the risk of pancreatic cancer. *Gut*. 2002; 51(2): 236-9.
- 17 Gudjonsson G. Cancer of the pancreas. 50 years of surgery. *Cancer*. 1987; 60: 2484-303.
- 18 Douglas BR, Woutersen RA, Jansen JB, de Jong AJ, Rovati LC, Lamers CB. Modulation by CR1409 (lorglumide), a cholecystokinin receptor antagonist, of trypsin enhanced growth of azaserine-induced putative preneoplastic lesions in rat pancreas. *Cancer Res*. 1989; 49(1): 2438-41.
- 19 Roebuck BD. Dietary fat and the development of pancreatic cancer. *Lipids*. 1992; 27(10): 804-6.

- 20 Stolzenberg-Solomon RZ, Pietinen P, Barrett MJ, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Dietary and other methyl-group availability factors and pancreatic cancer risk in a cohort of male smokers. *Am J Epidemiol.* 2001; 153(7): 680-7.
- 21 Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS. Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA.* 2001; 286(8): 967-8.
- 22 Ojajarvi A, Partanen T, Ahlbom A, Boffetta P, Haukulinen T, Jourenkova N et al. Risk of pancreatic cancer in workers exposed to chlorinated hydrocarbon solvents and related compounds: a meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2001; 153: 841-50.
- 23 Schwartz GG, Reis IM. Is cadmium a cause of human pancreatic cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9(2): 139-45.
- 24 Pettersson F, Ryberg M, Malker B. Second primary cancer after treatment of invasive carcinoma of the uterine cervix, compared with those arising after treatment for in situ carcinomas. An effect of irradiation? *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1990; 69: 161-74.
- 25 Cavestro GM, Comparato G, Nouvenne A, Sianesi M, Di Mario F. The race from chronic pancreatitis to pancreatic cancer. *JOP J Pancreas.* 2003; 4(5): 165-168.
- 26 Farrow B, Evers BM. Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surgical Oncology.* 2002; 10: 153-69.
- 27 Lowenfels AB, Maisonneuve P, Lankisch PG. Chronic pancreatitis and other risk factors for pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 1999; 28: 673-85.
- 28 Talamini G, Falconi M, Bassi C, Sartori N, Salvia R, Caldiron E et al. Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94(5): 1253-60.
- 29 Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Levy P, Ruszniewski P. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut.* 2002; 51(6): 765-6.
- 30 Dítě P, Pazourková M, Růžička M, Přecechtělová M, Novotný I, Dastych M. Chronická pankreatitida jako rizikový faktor karcinomu pankreatu. *Vnitřní lékařství.* 2002 (48)7: 638-41.
- 31 McCarty MF. Insulin secretion as a determinant of pancreatic cancer risk. *Med Hypotheses.* 2001 Aug; 57(2): 146-50.
- 32 Fisher WE. Diabetes: risk factor for the development of pancreatic cancer or manifestation of the disease? *World J Surg.* 2001; 25(4): 503-8.
- 33 Ghadirian P, Lynch HT, Krewski D. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Cancer Detect Prev.* 2003; 27(2): 87-93.
- 34 Tascilar M, van Rees BP, Sturm PD, Tytgat GN, Hruban RH, Goodman SN et al. Pancreatic cancer after remote peptic ulcer surgery. *J Clin Pathol.* 2002; 55(5): 340-5.
- 35 Schernhammer ES, Michaud Ds, Leitzmann MF, Giovannucci E, Colditz GA, Fuchs CS. Gallstones, cholecystectomy, and the risk for developing pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2002; 86(7): 1081-4.
- 36 Ye W, Lagergren J, Nyren O, Ekblom A. Risk of pancreatic cancer after cholecystectomy: a cohort study in Sweden. *Gut.* 2001; 49: 678-81.
- 37 Li D, Jiao L. Molecular epidemiology of pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer.* 2003; (33)1: 3-14.
- 38 Lynch HT, Brand RE, Lynch JF, Fusaro RM, Kern SE. Hereditary factors in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2002; 9(1): 12-31.
- 39 Konner J, O'Reilly E. Pancreatic cancer: epidemiology, genetics, and approaches to screening. *Oncology (Huntingt).* 2002 Dec; 16(12): 1615-22, 1631-2.
- 40 Hall Pde L, Wilentz RE, de Klerk W, Bornmann PP. Premalignant conditions of the pancreas. *Pathology.* 2002; 34(6): 504-17.
- 41 Tersmette AC, Petersen GM, Offerhaus GJ, Falatko FC, Brune KA et al. Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(3): 738-44.

- 42 Brentnall TA, Bronner MP, Byrd DR et al. Early diagnosis and treatment of pancreatic dysplasia in patients with a family history of pancreatic cancer. *Ann Intern Med.* 1999; 131(4): 247-55.
- 43 Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. The Breast Cancer Linkage Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(15): 1310-6.
- 44 Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK Jr, Perrault J, Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International hereditary pancreatitis study group. *J Nat Cancer Inst.* 1997; 89(6): 442-6.
- 45 Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC, Lerch MM, DiMagno EP. Cigarette smoking as a risk factor for pancreatic cancer in patients with hereditary pancreatitis. *JAMA.* 2001; 28: 673-85.
- 46 Kreiger N, Lacroix J, Sloan M. Hormonal factors and pancreatic cancer in women. *Ann Epidemiol.* 2001; 11(8): 563-7.
- 47 Almoguera C, Shibata D, Forrester K et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988; 53: 549-554.
- 48 Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 459-465.
- 49 Ko AH, Tempero MA. Systemic therapy for pancreatic cancer. *Semin Radiat Oncol* 2005; 15: 245-253.
- 50 Wallace JA, Locker G, Nattam S et al. Sorafenib plus gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium. *ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium.* 2007: abstract no. 137.
- 51 Barton CM, Hall PA, Hughes CM et al. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human pancreatic cancer. *J Pathol* 1991; 163: 111-116.
- 52 Marshall J. Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer* 2006; 107: 1207-1218.
- 53 SWOG S0502: phase III randomized study of gemcitabine with versus without cetuximab as first-line therapy in patients with locally advanced unresectable or metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Clin Adv Hematol Oncol* 2004; 2: 201-252.
- 54 Ozawa F, Friess H, Tempia-Caliera A et al. Growth factors and their receptors in pancreatic cancer. *Teratog Carcinog Mutagen* 2001; 21: 27-44.
- 55 Kindler HL, Friberg G, Hollis D et al. Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2239-2245.
- 56 Kindler HL, Niedzwicki D, Hollis D et al. Double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of gemcitabine plus bevacizumab versus gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: A preliminary analysis of Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 80303. *ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium.* 2007: abstract no. 108.
- 57 Hermanová M, Lukáš Z, Nenutil R et al. 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.
- 58 Rozenblum E, Shutte M, Gogins M et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1731-1734.
- 59 Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 2004; 116: 235-246.
- 60 Peng DF, Kanai Y, Sawada M et al. DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis* 2006; 27:1160-1168.
- 61 Hruban RH, Iacobuzio-Donahue CA, Willentz RE. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J* 2001; 7: 251-258.

- 62 Rane SG, Lee JH, Lin HM. Transforming growth factor-beta pathway: role in pancreas development and pancreatic disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 107-119.
- 63 Willentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P et al. Loss of expression of DPC4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 2000; 60: 2002–2006.
- 64 Zapatka M, Zboralski D, Radacz Y et al. Basement membrane component laminin-5 is a target of the tumor suppressor Smad4. *Oncogene* 2007; 25: 1417-1427.
- 65 Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 506-520.
- 66 Levy L, Hill CS. Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor β (TGF- β) target genes and distinguishes TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 8108-8125.
67. Klöppel G, Hruban RH, Longnecker DS, Adler G, Kern SE, Partanen TJ: Ductal adenocarcinoma of the pancreas, in: Hamilton SR, Aaltonen LA (Eds.): *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. WHO Classification of Tumours, Lyon : IARC Press, 2000, 221-230.
68. Klöppel G, Lüttges J, Zamboni G, Scarpa A. Classification of pancreatic neoplasms and their genetics. In: Gress TM, Neoptolemos JP (Eds.): *Exocrine pancreas cancer*. The European Pancreatic Cancer-Research Cooperative, Hannover, 2005, 64-84.
69. Andrianifahanana M, Moniaux N, Schmied BM, Ringel J, Friess H, Hollingsworth MA, Büchler MW, Aubert JP, Batra SK. Mucin (MUC) gene expression in human pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a potential role of MUC4 as a tumor marker of diagnostic significance. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 4033-4040.
70. Biankin AV, Kench JG, Dijkman FP, Biankin SA, Henshall SM. Molecular pathogenesis of precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathology*, 2003, 35: 14-24.
71. Talar-Wojnarowska R, Malecka-Panas E. Molecular pathogenesis of pancreatic adenocarcinoma: Potential clinical implications. *Med Sci Monit*, 2006, 12: 186-193.
72. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Offerhaus GJ. Pancreatic intraepithelial neoplasia. A new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*, 2001, 25: 579–586.
73. Klimstra DS, Longnecker DS. K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. *Am J Pathol*, 1994, 145: 1547–1550.
74. Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE. Genetic Progression in the Pancreatic Ducts, *Am J Pathol*, 2000;156: 1821-1825.
75. Tanaka M, Chari S, Adsay V, del Castillo CF, Falconi M, Shimizu M, Yamaguchi K, Yamao K, Matsuno S. International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Pancreatology* 2006; 6: 17–32.
76. Lüttges J, Zamboni G, Longnecker D, Klöppel G. The immunohistochemical mucin expression pattern distinguishes different types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas and determines their relationship to mucinous noncystic carcinoma and ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 942–948.
77. Chari S, Yadav D, Smyrk TC, DiMagno EP, Miller LJ, Massimo M, Clain JE, Norton IA, Farnell MB, Sarr MG. Study of recurrence after surgical resection of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Gastroenterology* 2002; 123: 1500–1507.
78. Zamboni G, Scarpa A, Bogina G, Iacono C, Bassi C, Talamini G, Sessa F, Capella C, Solcia E, Rickaert F, Mariuzzi GM, Klöppel G. Mucinous cystic tumors of the pancreas: clinicopathological features, prognosis, and relationship to other mucinous cystic tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 410–422.

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 tenkojehlové biopsie (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 specificity 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. VÝSLEDKY

Tato kapitola obsahuje plné znění tří publikací vypracovaných k tématu disertační práce:

- Šálek C, Zavoral M, Benešová-Mináriková L, Jelínková M, Traboulsi E, Hrabal P, 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 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.

Detection of K-ras mutations in pancreatic cancer samples collected by fine needle aspiration biopsy: an intermediate report on the first results and experience

Cyril Šálek^{1,2,3,4}, Miroslav Zavoral^{1,2,3}, Lucie Benešová-Mináriková⁴, Marcela Jelínková⁴,
Eva Traboulsi⁵, Petr Hrabal⁵, Vladimír Nosek¹, Marek Minárik⁴

- (1) Second Department of Internal Medicine, Central Military Hospital, Praha, Czech Republic
- (2) Department of Gastroenterology and Hepatology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Praha, Czech Republic
- (3) Department of Gastroenterology, Institute for Postgraduate Medical Education, Praha, Czech Republic
- (4) Laboratory for Molecular Oncology, Genomac International, Praha, Czech Republic
- (5) Department of Pathology, Central Military Hospital, Praha, Czech Republic

Folia Gastroenterologica et Hepatologica 2004; 2 (4): 150–155.

ABSTRACT

Background and aims. Somatic mutations in KRAS oncogene are widely considered as early events in pancreatic cancerogenesis, with frequencies of close to 90 % in developed pancreatic cancers. Their occurrence in premalignant intraepithelial stages suggests potential for diagnostic and screening purposes of risk individuals by means of diagnostic testing based on fine needle aspiration biopsy. Recently, several groups have demonstrated detection of KRAS mutations in pancreatic resection tissue. This paper presents a report on sensitive detection of KRAS mutations directly in biopsy tissue from pancreatic cancer patients.

Methods. Fine needle aspiration biopsy samples were taken from a total of 35 individuals diagnosed with primary suspicious pancreatic mass during endoscopic ultrasonography examination. The aspirates were evaluated cytologically and were subjected to molecular-genetic analysis of KRAS mutations. The definite malignant status of the tumours was subsequently confirmed from resections following a surgery and/or a long-term follow-up.

Results. Of 30 patients with confirmed pancreatic cancer status, 21 (70 %) exhibited malignant positivity for both, cytology and KRAS mutation test, 2 patients (6.7 %) had negative cytology tests while carrying a KRAS mutation and 3 patients (10 %) had positive cytology with no KRAS mutations. In 4 patients (13.3 %) with subsequently confirmed pancreatic cancer, neither of the two tests were positive. Sensitivity of single cytologic evaluation was 80 %, sensitivity of cytology combined with KRAS mutation test reached 90 %. As a result of cases with positive cytology and no KRAS mutations, the original technique of parallel examination of dissected bioptic tissue by the two tests was modified to a tumour-targeting approach, in which KRAS mutations are detected directly from cytology smears.

Conclusion. The results obtained from this initial study confirmed a high frequency of KRAS mutations in bioptic tissue samples from pancreatic tumours. Fine needle aspiration biopsy was confirmed as a suitable method of sampling for purposes of molecular diagnostics testing in addition to classic cytology test.

Introduction

Despite significant progress in research and a generally better understanding of the molecular and genetic basis of malignant diseases acquired over the past decade, pancreatic cancer remains a mostly fatal disease (14). Late diagnosis of advanced stages of pancreatic cancer is the major cause of its extremely negative prognosis. The most critical issue for a surgical resection, which represents the only method of treatment, is uncovering the very early stages of pancreatic cancer or better yet, detecting premalignant lesions referred to as PanIN - pancreatic intraepithelial neoplasia (8). Most currently applied diagnostic approaches rely on evaluation of morphological changes in pancreatic tissue in combination with histology/cytology examination of samples obtained by fine-needle aspiration (FNA) (5). The development of pancreatic cancer follows a distinct path from normal ductal epithelia, inflammatory tissue, PanIN phase I - III up to the carcinoma (7). This path is accompanied by sequential accumulation of genetic changes (mostly point mutations, gene amplifications and allelic deletions). In order to increase diagnostic sensitivity of the FNA cytology, several papers have demonstrated detection of selected genetic changes in DNA material obtained from pancreatic duct brushings, percutaneous biopsies, or plasma as potential molecular markers for PC (4,11,18,19,23).

An early event in pancreatic carcinogenesis is activation of KRAS oncogene by somatic point substitution (1). This alteration can already be detected already in PanIN-1A lesions as well as in chronic pancreatitis and therefore represents an independent risk factor for pancreatic cancer. In advanced pancreatic cancer, KRAS mutation is found in nearly to 90 % of cases, therefore considered as a potential molecular marker for early detection of pancreatic cancer (15). Following the initial KRAS activation, a number of other genetic abnormalities take place. PanIN-1A and PanIN-1B phases are characterized by overexpression of HER-2/neu oncogene, which is found in 50 % of pancreatic neoplasms (5).

Increased HER-2/neu expression, however, is a result of higher transcription rate rather than gene amplification, rendering HER-2/neu not a good therapeutic target (6). Aside from the above-mentioned oncogenes, there are a number of tumour suppressor genes affected by genetic alterations during the pancreatic cancer transformation process. Among them, *p16^{INK4A}* tumour-suppressor is already inactivated in transition from PanIN-1B to PanIN-2 phases (3). The *p16* is inactivated in almost 95 % of cases of invasive pancreatic cancer, therefore also represents a suitable molecular marker.

The most important goal is to uncover patients with chronic pancreatitis that are at a higher risk of developing pancreatic cancer. KRAS mutation is detected in about one third of chronic pancreatitis aspirates (2,16), and patients with mutated KRAS oncogene and loss of *p16* expression are considered to be carriers of independent risk factors for development of pancreatic cancer (17,21). Other tumour-suppressor genes from the pancreatic cancerogenesis such as *p53*, *DPC4* and *BRCA2* become inactivated in a later, PanIN-3, phase with overall lower frequency, hence, their potential for screening of high-risk individuals is lower (20).

In the current paper, we describe initial results, discuss experimental issues and share some experience acquired with detecting KRAS mutations in samples obtained by FNA.

Methods

The thirty-five patients with pancreatic mass (21 males, 14 females, aged 39 - 76, median 63) underwent initial examination with endoscopic ultrasonography guided FNA in order to confirm malignant diagnosis or to differentiate between cancer and inflammatory pseudo-tumour status. FNA biopsies were taken from pancreatic mass, mostly located in the head of the pancreas, a minority of lesions originated in the body of the gland. The ultimate diagnosis was determined based on subsequent surgery or a continuing follow-up. The acquired

aspirates were divided into two parts where the first part was evaluated by standard cytopathology and the second part was immediately frozen for molecular-genetic analysis.

Results from cytopathology were classified into three groups: 1) positive findings where the smears were diagnostic of malignant or benign disease; 2) inconclusive or borderline findings where not enough ductal epithelia was present to state diagnosis, or where epithelial atypia did not allow to distinguish cytologically pancreatic cancer from severe chronic pancreatitis; 3) negative findings where no ductal epithelia was detected.

During molecular-genetic analysis, KRAS hotspot codons 12 and 13 of exon 1 were examined for the presence of mutations. Genomic DNA was isolated from the frozen bioptic tissue using JetQuick isolation kit (Genomed GmbH, Loehne, Germany). Extracted DNA was subjected to PCR amplification with fluorescently labeled PCR primers using optimized conditions for amplification of KRAS target sequence (see Table 1). Mutant controls were prepared by PCR mutagenesis by amplification of a wildtype DNA with a special extension on one of the PCR primers. The extension included the mutated base in place of the wildtype base. Following PCR amplification, mutant heteroduplexes were formed by heating and reannealing and analyzed on a multi-capillary array analyzer (MegaBACE 1000, Amersham Biosciences, Sunnyvale, California, USA) using periodically cycling temperature gradient (12). The genetic analyzer was equipped with a Caddy plate loading robot (Watrex Praha, Czech Republic) for unattended operation. The separation took place in a standard denaturing gel matrix (MegaBACE long-range matrix, Amersham Biosciences) containing 7M urea. The running conditions included injection for 120 seconds at 3 kV and running at 6 kV for 90 minutes. The cycling gradient temperature profiles were created using MBCS software version 2.0 (Genomac International, Praha, Czech Republic). CGCE running conditions used in this work are listed in Table 1.

Target	Primer sequence	Theoretical melting temperature	CGCE temperature range
K-ras	5'-atgactgaatataaactgtg-3' 5'-FL-[GC]- CCTCTATTGTTGGATCATATTC-3'	70 °C	52 - 50 °C
[GC] denotes a high-melting clamp: CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG FL denotes labelling by fluorescein			

Table 1: Optimized conditions for PCR amplification of KRAS sequence and mutation detection by CGCE technique (13).

The ethical committee of the Institute for postgraduate medical education has approved this study and all patients enrolled have signed informed consent to genetic tests performed on their samples.

Results

Genomic DNA was extracted from 34 out of the 35 originally collected samples. One patient with negative cytology was excluded from the study for high probability of no ductal epithelia in the tissue aspirate. Of the remaining 34 patients a decisive diagnosis of pancreatic adenocarcinoma was confirmed in 30 cases, chronic pancreatitis in 2 cases, 1 case was a benign pancreatic tumour and 1 mesenchymal tumour (malignant fibrous histiocytoma). The results are summarized in Table 2. In the group of 30 patients with confirmed PC status, 21 patients (70 %) showed positivity for both FNA cytology test as well as KRAS mutation test. A positive cytopathology without positive KRAS test was obtained from 3 patients (10 %), while 2 patients (7 %) exhibited presence of KRAS mutation with negative results from cytology. For the remaining 4 pancreatic cancer patients (13 %), neither of the two tests was positive and the malignancy was only confirmed at the surgery. All detected KRAS mutations were located in codon 12 of exon 1. In one patient the original positive KRAS mutation status

from the FNA biopsy was later confirmed in an autopsy sample. The same codon 12 mutation was found in both, biopsy as well as autopsy samples.

	K-ras positive	K-ras negative	Total
Cytology positive	21 (70 %)	3 (10 %)	24 (80 %)
Cytology negative	2 (7 %)	4 (13 %)	6 (20 %)
Total	23 (77 %)	7 (23 %)	30 (100%)

Table 2: Summary of results of cytology test with KRAS mutation detection test.

Sensitivity of cytology evaluation was 80 %, sensitivity of cytology combined with evaluation of KRAS mutation status increased to 90 %. However, the difference between both methods was not statistically significant for difference of only two patients between the two groups.

Discussion

The overall frequency of KRAS mutations found in pancreatic cancer aspirates was 76.7 %, confirming the widely acknowledged significant incidence. The frequencies reported in literature were mostly within a range from 75 to 100 %, with frequency between 61 % and 80 % in pancreatic juice (4,15), 70–73 % in pancreatic duct brushings (11), and 80–100 % in FNA aspirates (22). Compared to those values, FNA frequency found in this work was slightly lower. This was most likely due to suboptimal processing of the samples. The originally applied method of splitting the bioptic tissue in two parts and examining the parts by the two separate methods (cytology vs. molecular-genetics) clearly introduces a possibility of inconsistency in results in case of sample heterogeneity. Similarly, the absence of KRAS mutations in the 3 cases of positive cytology leads to a need of examining DNA from the same material, which was evaluated by a pathologist. Therefore, in the next phase, DNA will be isolated directly from cellular smears stained by May-Grünwald-Giemsa technique on

which cytopathological diagnosis is stated. This technique avoids genotoxic liquids during staining procedure so samples are optimal for subsequent genetic analysis. With such a tumour-targeting approach, we expect to increase the current frequencies of positive KRAS detection, but more importantly, to increase the potential for detecting other prospective molecular markers such as *p16* mutations or DPC allelic deletions, which naturally occur with lower frequencies.

In contrast to the tumour-targeting approach, mutation detection sensitivity is the most important factor for applying the molecular marker screening in pancreatic cancer diagnostic screening. The issue of mutations detection sensitivity is the key in finding small populations of mutated cells in an excess of normal cells (10). This is a legitimate concern in bioptic tissue samples, where often only a fraction of mutated cells is captured in a surrounding of normal unaltered tissue or blood cells. An example of the difference in the fraction of mutated cells is shown in Figure 1. The normal tissue with no detection of mutated DNA (Figure 1A) shows a single PCR product for the wildtype KRAS sequence. A sample containing a large portion of mutated cells (clean cancerous tumour) produces a heteroduplex pattern with the most significant peak of the mutated PCR sequence (Figure 1B). The most common scenario is the one with a low fraction of mutated DNA copies. Such a sample also produces a pattern of heteroduplexes with the most significant peak from the wildtype PCR sequence followed by lower intensity mutant PCR sequences (Figure 1C). With a sufficient level of sensitivity the mutation pattern from Figure 1B is already distinguishable from the single peak pattern representing normal tissue in Figure 1A. Based on our previous experience, we estimate the current sensitivity limit of our technique (heteroduplex separation in temperature gradients) at 5–10 % of mutated DNA copies (cancer cells) in an excess of 95 % of normal DNA copies (normal cells) (13). Although this part of our study was not specifically directed at diagnosis of premalignant lesions, as an initial positive sign for this approach, KRAS mutations were

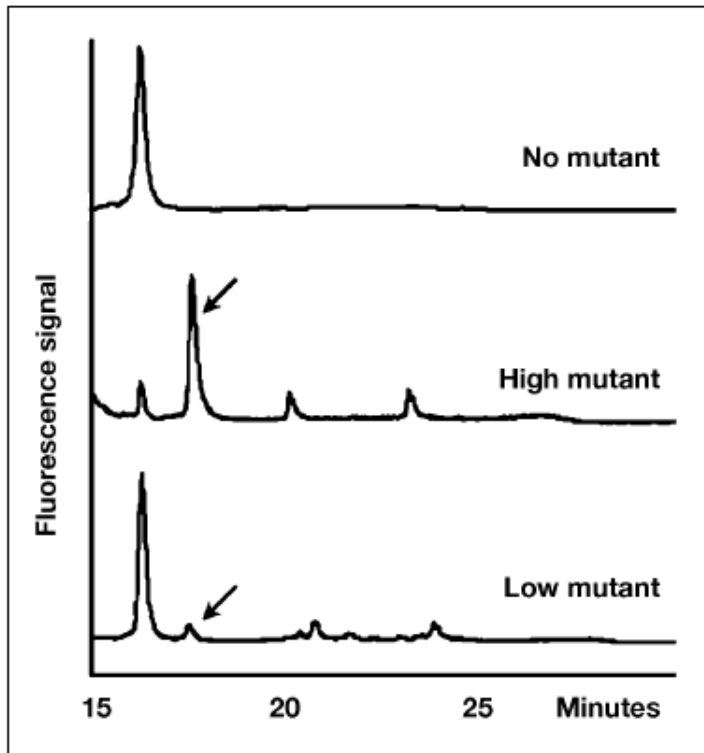


Figure 1: Illustration of result from mutation detection analysis in case of different fractions of mutated DNA copies in the tissue material. Normal tissue without mutations (A), cancerous tissue with large fraction of mutated cells (B), most common case with low fraction of mutated cells (C).

clearly visible in the 2 cases of ultimate malignancy, where the initial cytology was inconclusive and the clinical finding nonspecific. However, for more universal application it is expected that the required sensitivity is still below the current level. Therefore, for future diagnostic purposes it will be necessary to further increase the mutation detection sensitivity by alternative approaches such as pre-amplification and selective enrichment of mutants (9). Finally, it is expected that the 4 cases with inconclusive biopsy and no KRAS mutations were a result of the absence of ductal epithelia in the punctuate.

With the tumour-targeting, we expect to increase likelihood of finding also the less frequent mutations, thus broaden the range of potential diagnostic molecular markers to tumour-suppressor genes *p16* and *DPC4*. Naturally the genetic profiling of fine needle

aspirates represents a significant diagnostic potential for patients with chronic pancreatitis, who would profit from regular dispensatory examination (laboratory, CT, endoscopic ultrasonography) and early surgery (21). A large control group of patients with chronic pancreatitis is necessary in order to evaluate the test specificity.

Conclusion

We have demonstrated a pilot study on detecting KRAS mutations in FNA biopsy samples. The initial mutation frequencies were comparable to data published on mutation frequency found in pancreatic juice or pancreatic duct brushings, but lower when compared to equivalent FNA biopsy data. As a result, the methodology is to be modified, where instead of dissecting the biopsy sample for cytology and molecular-genetic evaluation, a tumour-targeting approach was applied in which DNA mutations were detected directly from cytology smears. We expect to broaden the current extent of the study to more patients and to add other prognostic markers in an ongoing continuation of this work.

Acknowledgment

This project is supported by the IGA Ministry of Health, No. NR/8027-3.

REFERENCES

1. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988; 53: 549 - 554.
2. Arvanitakis M, Van Laethem JL, Parma J, De Maertelaer V, Delhaye M, Deviere J. Predictive factors for pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis in association with K-ras gene mutation. *Endoscopy* 2004; 36: 535 - 542.
3. Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature Genet* 1994; 8: 27 - 32.
4. 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.

5. Day JD, Digiuseppe JA, Yeo C, Lai-Goldman M, Anderson SM, Goodman SN, Kern SE, Hruban RH. Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol* 1996; 27: 119 - 124.
6. Hermanová M, Lukáš Z, Nenučil 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.
7. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2969 - 2972.
8. Kern SE, Goggins MG, Hruban RH. Pancreas cancer: Molecular biology and genetics. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. VT Devita, S Hellman, SA Rosenberg, eds. 2th Ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins Publishers, 1985.
9. Khrapko K, Collier H, Andre P, Li XC, Foret F, Belenky A, Karger BL, Thilly WG. Mutational spectrometry without phenotypic selection: human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 685 - 693.
10. Li-Sucholeiki XC, Thilly WG. A sensitive scanning technology for low frequency nuclear point mutations in human genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E44.
11. Liu F, Li ZS, Xu GM, Sun ZX, Zhou GX, Ren XX, Tu ZX, Gong YF. Detection of K-ras gene mutation at codon 12 by pancreatic duct brushing for pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 313 - 317.
12. Minárik M, Mináriková L, Bjorheim J, Ekstrom PO. Cycling gradient capillary electrophoresis (CGCE): a low cost tool for highthroughput analysis of genetic variations. *Electrophoresis* 2003; 24: 1716 - 1722.
13. Minárik M, Mináriková L, Hrabíková M, Mináriková P, Hrabal P, Zavoral M. Application of cycling gradient capillary electrophoresis (CGCE) to detection of APC, K-ras and DCC point mutations in patients with sporadic colorectal tumors. *Electrophoresis* 2004; 25: 1016 - 1021.
14. Minárik M, Mináriková P. Molecular genetics of pancreatic cancer. In: *Pancreatic cancer*. M Zavoral, ed. Praha: Galén, 2005; 39 - 51.
15. Queneau PE, Adessi GL, Thibault P, Cleau D, Heyd B, Mantion G, Carayon P. Early detection of pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis: diagnostic utility of a K-ras point mutation in the pancreatic juice. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 700 - 704.
16. Ren YX, Xu GM, Li ZS, Song YG. Detection of point mutation in K-ras oncogene at codon 12 in pancreatic diseases. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 881 - 884.
17. Rosty C, Geradts J, Sato N, Wilentz RE, Roberts H, Sohn T, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. p16 Inactivation in pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs) arising in patients with chronic pancreatitis. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1495 - 1501.
18. Sawabu N, Watanabe H, Yamaguchi Y, Ohtsubo K, Motoo Y. Serum tumor markers and molecular biological diagnosis in pancreatic cancer. *Pancreas* 2004; 28: 263 - 267.
19. 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.
20. van Heek T, Rader AE, Offerhaus GJ, McCarthy DM, Goggins M, Hruban RH, Wilentz RE. K-ras, p53, and DPC4 (MAD4) alterations in fine-needle aspirates of the pancreas: a molecular panel correlates with and supplements cytologic diagnosis. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 755 - 765.
21. Wong T, Howes N, Threadgold J, Smart HL, Lombard MG, Gilmore I, Sutton R, Greenhalf W, Ellis I, Neoptolemos JP. Molecular diagnosis of early pancreatic ductal adenocarcinoma in high-risk patients. *Pancreatol* 2001; 1: 486 - 509.
22. 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.
23. Zhou GX, Huang JF, Li ZS, Xu GM, Liu F, Zhang H. Detection of K-ras point mutation and telomerase activity during endoscopic retrograde cholangiopancreatography in diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1337 - 1340.

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

Cyril Šálek^{1,2,3}, Lucie Benešová², Miroslav Zavoral^{1,3}, Vladimír Nosek¹, Lucie Kašperová², Miroslav Ryska⁴, Robin Strnad⁴, Eva Traboulsi⁵, Marek Minárik²

- (1) Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, Central Military Hospital and 1st Medical Faculty of Charles University, Prague, Czech Republic
- (2) Laboratory for Molecular Genetics and Oncology, Genomac International Ltd., Prague, Czech Republic
- (3) Department of Gastroenterology, Institute for Postgraduate Medical Education, Prague, Czech Republic
- (4) Department of Surgery, Central Military Hospital and 2nd Medical Faculty of Charles University, Prague, Czech Republic
- (5) Department of Pathology, Central Military Hospital, Prague, Czech Republic

World Journal of Gastroenterology 2007; 13: 3714–3720
IF 3,318 (v roce 2004)

ABSTRACT

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, we examine some of the most characteristic genetic changes occurring in pancreatic neoplasia from patients undergoing FNA biopsy to reveal their usefulness in routine clinical diagnostic testing.

Aim: To establish an optimum combination of molecular markers resulting in best overall diagnostic sensitivity and specificity.

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, *p53* and *p16* 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.

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), 13% and 100%

for *p16* 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.

Conclusion: 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.

Key words: Pancreatic cancer; Chronic pancreatitis; EUS-guided FNA; Molecular markers; LOH

INTRODUCTION

Enormous progress in diagnostic and therapeutic approaches in the last decade had very limited impact on generally poor survival rates of patients diagnosed with pancreatic cancer (PC)^[1]. Mortality of the disease is almost at the level of its incidence as the majority of cases is diagnosed in advanced, not resectable stage^[2]. Since the fundamental molecular-genetic mechanisms of PC have already been recognized, there is a great expectation that molecular tests could substantially assist in early diagnosis as well as open new therapeutic possibilities for this serious disease^[3,4].

The development of pancreatic cancer follows a distinct path from normal ductal epithelia, pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN I–III) up to the carcinoma^[5,6]. This path is accompanied by sequential accumulation of genetic defects (mostly point mutations, gene amplifications and allelic deletions). Activation of KRAS oncogene by somatic point substitution is seen as an initial event in pancreatic carcinogenesis is^[7]. This alteration can be detected already in PanIN-1A lesions as well as in chronic pancreatitis (CP) and therefore represents an independent risk factor for pancreatic cancer. In advanced pancreatic cancer, KRAS mutations are found in close to 90% of cases, therefore considered as a potential molecular marker for early detection of developing cancer. Following the initial KRAS activation, a number of other genetic abnormalities take place. PanIN-1A and PanIN-1B phases are characterized by overexpression of HER-2/neu oncogene, which is found in 50% of pancreatic neoplasms. Increased HER-2/neu expression, however, is a result of higher transcription rate rather than gene amplification, rendering HER-2/neu an unusable therapeutic target^[8]. Aside from the above oncogenes, there is a number of tumor suppressor genes affected by genetic alterations during the transformation process. Among them, *p16* tumor-suppressor (also referred to as CDKN2 or INK4), located at chromosome 9p21 is inactivated already during transition from PanIN-1B to PanIN-2 phases^[9]. Furthermore, loss

of another important tumor-suppressor gene, SMAD4 (known also as deleted in pancreatic carcinoma, DPC4), located at chromosome 18q21 has also been observed^[10]. Consequently, the *p16* and DPC4 are inactivated in almost 95% (55% respectively) of cases of invasive pancreatic cancers, therefore, potentially useable as molecular markers. All of the genetic mutation events adversely affect control of the cell cycle, thus enabling defected cells to proliferate. Oncogene KRAS encodes for GTP-binding protein responsible for signaling in MAP-kinase pathway of intracellular signal transduction^[11]. Tumor suppressor gene *p53* is translated into a product that regulates transcription of other regulatory proteins, such as p21, inhibitory protein of cyclinD/CDK2 family^[12]. The product of *p16* tumor suppressor binds to the complex of cyclinD/CDK4 or CDK6, and thus regulates progression of cell cycle at the G1 control point^[13]. Finally, the DPC4 tumor suppressor is a member of SMAD protein family which play crucial role in intracellular signaling of TGF-beta^[14].

Current diagnostic approaches mostly rely on evaluation of morphological changes in pancreatic tissue in combination with histology/cytology examination of samples obtained by fine-needle aspiration (FNA)^[15]. EUS-guided FNA typically delivers sensitivity of 80% and specificity of 99%, while its positive and negative predictive values are at 99%, and 73% levels^[16]. In order to increase diagnostic sensitivity of the FNA cytology, several papers have demonstrated detection of somatic aberrations as potential markers for early pancreatic cancer in DNA material from pancreatic juice, pancreatic ductal brushings, peroperative or percutaneous biopsies, plasma, duodenal aspirate, bile or stool. Among the various molecular markers in pancreatic cancer, KRAS is the most frequently studied. Its prevalence is estimated to reach 90%–95%. The reported rates of positivity, however, depend on experimental method of KRAS mutation detection as well as on the source material in which presence of KRAS mutations is to be detected. The capture rates range from 78%–100% in pancreatic tissue^[17], 61%–89% in pancreatic juice^[18,19], 72%–83% in pancreatic ductal

brushing^[20,21], 35% in plasma^[22], 33% in bile^[23], and 25% in duodenal aspirate^[24]. Detection of KRAS in stool gives better sensitivity than in bile, however specificity drops significantly^[25]. Acceptable specificity was reported only in pancreatic ductal brushings and pancreatic juice (77%–100%).

Because of the high sensitivity of genetic testing in pancreatic juice, numerous mutations in other genes have been reported in this material. Sensitivity and specificity of genetic tests in pancreatic juice is 40%–89% and 33%–96% for KRAS^[26,27], 11%–43% and 70%–100% for *p16*^[18,28,29], 14%–47 % and 88%–100% for *p53*^[25,30], 36%–70% and 39%–100% for DPC4^[18,31]. The combination of several molecular markers in pancreatic juice is believed to improve sensitivity of genetic testing, giving best results for combination KRAS plus *p53* which resulted in 100% sensitivity^[30]. In contrast to pancreatic juice analysis there is only a limited number of publication on frequency of gene mutations in EUS-guided FNA samples. Takahashi's study which included 62 consecutive patients with focal pancreatic mass is the largest. The authors screened for KRAS mutations and gave 74% sensitivity with 100% specificity^[32].

From the original PC progression model it is clear that the pancreatic malignant conversion comes from a combination of multiple genetic events rather than originating from a single mutation^[3,5]. Given the inherent heterogeneity of the carcinogenic pathways, simultaneous examination of multiple markers should lead to improved testing efficacy. The aim of the presented work was to evaluate a possibility of examining several somatic genetic events as potential molecular markers for early detection of pancreatic cancer in risk groups, such as in chronic pancreatitis patients. The main emphasis was on finding an ideal combination of markers bringing the optimum results when used in combination with commonly used cytology readings.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

106 consecutive patients with focal pancreatic mass undergoing EUS-guided fine needle aspiration (FNA) were enrolled into the study. Patients were divided into pancreatic cancer group and the control group of patients with chronic pancreatitis based on histology of surgical specimen or long term follow-up. Five patients were excluded due to other diagnosis (adenoma, malignant fibrous histiocytoma, endocrine tumor, cholangiocarcinoma), or for malignant duplicity (patient with a breast carcinoma).

Of 101 patients in the final group a total of 63 (62%) were males and 38 (38%) females. The mean age in the group was 60 ± 12 years, range 32–84 years ($+2,01/-2,21$ standard deviation). There were 81 (80%) patients with pancreatic cancer, and 20 (20%) patients with chronic pancreatitis. All patients signed informed consent with participation in the study as well as with genetic analysis of their tissue material.

Methods

EUS was performed by a single experienced endoscopist using GFUM-20 radial and GFUCT-140 linear array scanning echoendoscopes (Olympus Europe). Quality of FNA samples was evaluated by on-site cytologist after quick staining by hematoxylin-eosin. Definitive FNA diagnosis was stated by a single pathologist, blinded to the EUS, after staining additional slides by Giemsa. The same samples were subsequently submitted for genetic analysis. Furthermore, in a subset of 18 patients the genetic analysis of FNA sample was extended to genetic analysis of tissue acquired during subsequent peroperation biopsy. Laser microdissection of Giemsa-positive cells was performed on P.A.L.M. Microlaser instrument (Carl Zeiss, Germany). Normally, between 100 and 200 cells were dissected from each slide.

Genomic DNA was extracted from the dissected cells by a standard spin-column extraction protocol using GMC tissue DNA isolation kit (Genomac, Czech Republic).

Presence of somatic point mutations in codons 12 and 13 of KRAS and in exons 5–8 of *p53* was detected by cycling-gradient capillary electrophoresis (CGCE), a high-sensitivity mutation detection technique based on heteroduplex analysis in temperature gradient^[33]. The experimental details of the KRAS and *p53* mutation assay were described previously^[34,35]. Briefly, a PCR amplification of the target sequence containing the mutation hotspots was performed with one of the primers fluorescently labeled and the other primer extended by a 40bp artificial high-melting domain (GC-clamp). Following PCR, the 140 bp fragment was heated and slowly cooled to allow formation of homo- and heteroduplex forms upon re-annealing of wildtype and mutant sequences. The resulting double-stranded fragments were subjected to capillary-electrophoretic separation at cycling temporal temperature gradient. A typical result is shown in Figure 1.

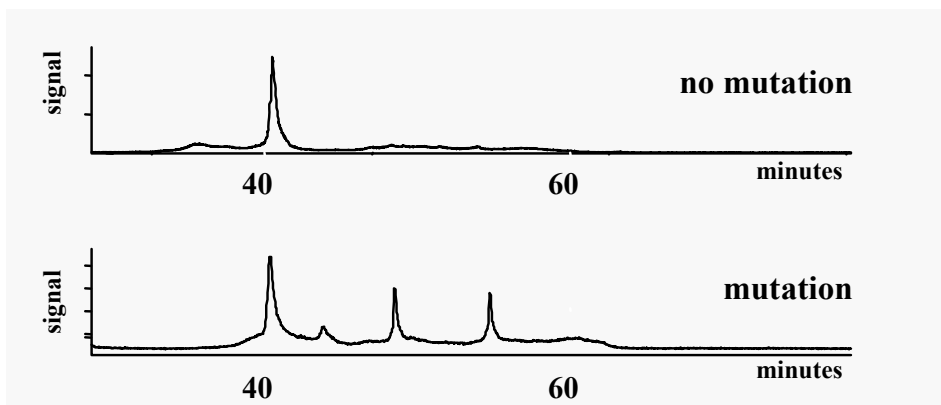


Figure 1 An example of the KRAS mutation analysis by CGCE method. **A:** sample without mutation; **B:** sample with KRAS mutation in codon 12.

Mutations in *p16* gene were analyzed by standard single-strand conformation polymorphism (SSCP) using amplification conditions previously described in literature^[36,37] followed by capillary electrophoresis analysis of the resulting fragments in non-denaturing gel matrix (GMC-SSCP, Genomac, Czech Republic).

Allelic losses at chromosomal positions 9p and 18q were monitored by the loss of heterozygosity analysis (LOH) using a total of 3 microsatellite (STR) markers for 9p (D9S157, D9S171 and D9S1748) and 2 markers for 18q (D18S363, D18S474)^[38,39]. Detected LOH at chromosomal site 9p is shown in Figure 2.

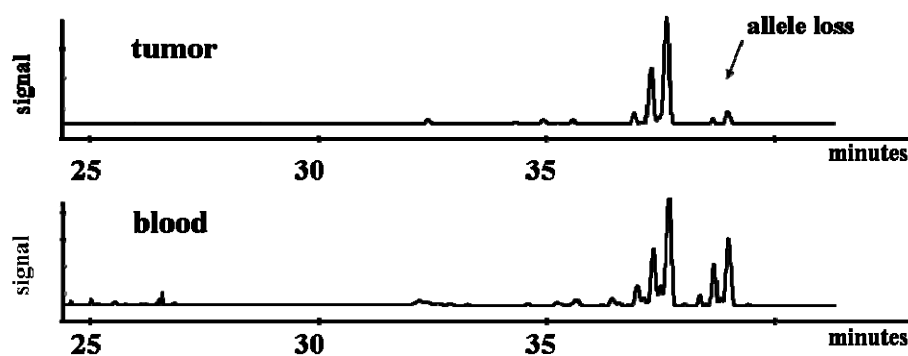


Figure 2 An example of LOH at chromosome 9p, analysis by CGCE method. **A:** tumor sample with allelic loss; **B:** blood sample with both alleles present.

All capillary electrophoretic experiments including previously described temperature-gradient, SSCP and fragment analysis were performed on capillary-array DNA sequencer (MegaBACE™ 1000, GE Healthcare, Piscataway, NJ) equipped with Caddy™ 1000 robotic sample loader (Watrex Praha, Prague, Czech Republic) for unattended overnight operation.

Statistical analysis

Statistical analysis was based on two-way and multiway contingency tables, sensitivity and specificity of tests and on 95% confidence interval of relative frequencies with use of BMDP PC90 and MedCalc software.

RESULTS

The data in the study represent patients collected within a 2-year-period from 2003 to 2005. Due to a dismal nature of the disease the total project time period exceeded by far the mean

survival rate of pancreatic cancer patients enrolled in this study. The ultimate diagnosis of the malignant disease could, therefore, be unequivocally assigned based on clinical follow-up. During the final statistical analysis and evaluation, sensitivity and specificity of various diagnostic approaches performed during the patients' dispensarisation could later be accurately determined.

Clinical examinations

Endoscopic ultrasonography: Endoscopic ultrasonography (EUS) is considered the most sensitive method for visualising focal pancreatic lesions and staging of locoregional progression of the pancreatic disease^[40]. All patients in our group were subjected to EUS for initial evaluation of pancreatic lesions. The EUS differentiation between malignant or benign nature of the lesions resulted in 79% sensitivity and 77% specificity. The overall rate of false negatives was 5% and false positives 4%. In 11% of cases the endoscopist was not able to reliably state the diagnosis.

Fine-needle aspiration cytology (FNA-cytology): EUS-guided FNA cytology has been adopted as a routine method for all patients admitted to our gastroenterology department with a suspicion of pancreatic cancer. The main benefit of this safe method is in its sensitivity. At the same time, the acquired morphological information (TN staging) removes a need for additional diagnostic testing and/or surgery, surpassing CT or MR imaging^[41]. Following the initial test for specimen quality by a “quick-test” using hematoxylin-eosin staining immediately following the puncture, samples were stained by Giemsa and thoroughly evaluated by an experienced cytologist. In the present study the overall sensitivity and specificity for FNA cytology evaluation was 75% and 85% respectively; the positive and negative predictive value reached 100% with no malignant specimens assigned as benign or

vice versa.. In FNA testing, however, a 26% of smears were assigned as inconclusive. This mostly owing to the fact that the cellular atypia found in ductal epithelia did not allow clear differentiation between both diagnoses.

Histology of surgical resection tissue: Finally, in a subset of 18 patients, surgery was performed and collected pancreatic tissue was evaluated by pathologist. Histological evaluation of surgical resectate resulted ultimately in 100% specificity, but 95% sensitivity due to the fact that one resection sample was falsely evaluated as cancer-negative.

Molecular marker examination

Activating mutations in KRAS oncogene were found in 57 out of the total 101 samples. Comparison with the final diagnosis revealed that all KRAS positives were subsequently confirmed with malignancy, while none of the chronic pancreatitis samples exhibited KRAS mutation (Table 1). Hence, the resulting specificity was 100% and the sensitivity 70% with 95% CI (60%–80%). There were 24 (30%) cancerous specimens without KRAS mutation. Detecting mutations in tumor suppressor gene *p53* uncovered only 19 positive cases (total of 81 cases) with a sensitivity of 24% with 95% CI (14%–32%) and specificity of 90% with 95% CI (85%–95%) (Table 2). Similarly, low mutation rates were obtained for *p16* gene with 10 of 100 cases leading to only 13% sensitivity (95% CI 5%–9%), specificity was 100% (Table 3). 44 of the total of 66 samples exhibited allelic loss at 9p with the sensitivity of 85% with 95% CI (75%–94%) and specificity of 64% with 95% CI (53%–75%) (Table 4). Although 9p harbors *p16* tumor-suppressor gene, no correlation was found between occurrence of *p16* mutations and 9p allelic deletions. A combination of the two tests (*p16* mutations and losses at 9p) yielded overall sensitivity of 84% with the specificity of 64%, 95% CI (75%–94%) and (53%–75%) respectively. Sole LOH test at chromosomal position

18q, corresponding to a loss of tumor suppressor gene DPC4, was detected in 38 of 63 cases with sensitivity of 78% (95% CI 66%–89%) and specificity of 57% (95% CI 45%–69%) (Table 5).

When combining tests for independent molecular markers, the best results were obtained with a combination of KRAS and LOH 9p. Sensitivity and specificity of this combination were 92% with 95% CI (86%–99%) and 64% with 95% CI (53%–75%), respectively. Another promising combination was KRAS and LOH 18q resulting in sensitivity of 92% with 95% CI (85%–99%) and specificity of 57% with 95% CI (45%–69%). By combining two markers with high specificity KRAS and low-sensitivity *p53* a reasonable values were obtained: sensitivity of 74% with 95% CI (65%–83%) and specificity of 90% with 95% CI (85%–95%). This, however, does not significantly improve the sole KRAS test showing 70% sensitivity and 100% specificity as noted above. Similarly, a combination of the LOH tests performed on the two chromosomal loci (9p and 18q) resulted in the sensitivity of 92% with 95% CI (84%–99%) and specificity of 43% with 95% CI (31%–55%), which does not surpass combination of the relatively simpler KRAS mutation test with either of the individual LOH tests.

If three markers are taken in account, a combination of KRAS with both LOH (18q and 9p) show the highest sensitivity of 96% with 95% CI (91%–100%) and specificity of 43% with CI (31%–55%). The combination of *p53* with LOH 18q and 9p gives comparable results: sensitivity of 92% with 95% CI (85%–99%) and specificity of 43% with 95% CI (31%–55%). Combination of KRAS with both methods for detecting genetic variations in *p16* (SSCP and LOH 9p) results in sensitivity of 92% with 95% CI (85%–99%) and specificity of 64% with 95% CI (53%–75%) (Table 6).

Finally, fidelity of genetic testing in FNA-cytology smears versus resection tissue was evaluated in case of 18 patients where both sample types were obtained. There was no

Table 1. Test for KRAS mutations.

	chronic panceratitis, n(%)	pancreatic cancer, n(%)	total, n(%)
negative	20 (100)	24 (29.6)	44 (43.6)
positive	0 (0)	57 (70.4)	57 (56.4)
total	20 (100)	81 (100)	101 (100)

sensitivity: 70% 95% CI (60% – 80%)

specificity: 100%

Youden's Index: 70%

$P < 0.001$

Table 2. Test for p53 mutations.

	chronic panceratitis, n(%)	pancreatic cancer, n(%)	total, n(%)
negative	18 (90)	62 (76.5)	80 (79.2)
positive	2 (10)	19 (23.5)	21 (20.8)
total	20 (100)	81 (100)	101 (100)

sensitivity: 24% 95% CI (14% – 34%)

specificity: 90% 95% CI (85% – 95%)

Youden's Index: 14%

$P = 0.18$ (NS)

Table 3. Test for p16 mutations.

	chronic panceratitis, n(%)	pancreatic cancer, n(%)	total, n(%)
negative	20 (100)	70 (87.5)	90 (90)
positive	0 (0)	10 (12.5)	10 (10)
total	20 (100)	80 (100)	100 (100)

sensitivity: 13% 95% CI (7% – 19%)

specificity: 100%

Youden's Index: 13%

$P = 0.096$ (NS)

Table 4. Test for LOH at chromosome 9p (site of *p16* gene).

	chronic panceratitis, n(%)	pancreatic cancer, n(%)	total, n(%)
negative	9 (64.3)	8 (15.4)	17 (25.8)
positive	5 (35.7)	44 (84.6)	49 (74.2)
total	14 (100)	52 (100)	66 (100)

sensitivity: 85% 95% CI (75% – 95%)

specificity: 64% 95% CI (53% – 75%)

Youden's Index: 49%

$P < 0.001$

Table 5. Test for LOH at chromosome 18q (site of *DPC4* gene).

	chronic panceratitis, n(%)	pancreatic cancer, n(%)	total, n(%)
negative	8 (57.1)	11 (22.4)	19 (30.2)
positive	6 (42.9)	38 (77.6)	44 (69.8)
total	14 (100)	49 (100)	63 (100)

sensitivity: 78% 95% CI (67% – 89%)

specificity: 57% 95% CI (45% – 69%)

Youden's Index: 35%

$P < 0.05$

Table 6. Combination of tests for various molecular markers.

combination of tests			95% confidence interval	<i>P</i> value	Youden's Index
KRAS + LOH 9p	sensitivity	92%	85% – 99%	<0.001	57%
	specificity	64%	53% – 75%		
KRAS + LOH 18q	sensitivity	92%	85% – 99%	<0.001	49%
	specificity	57%	45% – 69%		
LOH 9p + LOH 18q	sensitivity	92%	85% – 99%	<0.01	34%
	specificity	43%	31% – 55%		
<i>p16</i> + LOH 9p	sensitivity	84%	74% – 94%	<0.001	49%
	specificity	64%	53% – 75%		
KRAS + <i>p53</i>	sensitivity	74%	65% – 83%	<0.001	64%
	specificity	90%	85% – 95%		
KRAS + LOH 9p + LOH 18q	sensitivity	96%	92% – 100%	<0.001	39%
	specificity	43%	31% – 55%		
KRAS + <i>p16</i> + LOH 9p	sensitivity	92%	85% – 99%	<0.001	57%
	specificity	64%	53% – 75%		
<i>p53</i> + LOH 9p + LOH 18q	sensitivity	92%	85% – 99%	<0.001	35%
	specificity	43%	31% – 55%		

discrepancy in KRAS, *p53* or *p16* mutation rates as the results were identical in both sample types. In contrary, however, FNA-cytology specimens proved to be more suitable for detection of allelic losses at 9p by LOH test ($P < 0.001$); higher sensitivity of FNA specimens for detection of LOH 18q was close to statistical significance ($P < 0.10$).

DISCUSSION

EUS-guided FNA-cytology is widely regarded as the “golden standard” in morphological diagnosis of the pancreatic neoplasms. In agreement with this common perception, our own experience also confirms a high diagnostic value of the technique with positive and negative predictive value reaching 100% over the course of the presented study. These results mirror high efficacy of the protocol if FNA biopsy is first evaluated on-site by the cytologist, and then conclusively interpreted by a skilled pathologist with proper experience in pancreatic cytology. This encouraging result, however, is reduced by the fact that in addition to the unequivocally assigned samples a remaining total of 26% of FNA smears are marked as inconclusive. This mirrors the fact that distinction between reactive changes in chronic pancreatitis and well differentiated adenocarcinoma may be problematic and cause underdiagnosis of pancreatic cancer^[42]. Hence, the resulting 74% success rate of FNA-cytology clearly opens a need for additional diagnostic tools.

Molecular diagnosis of early pancreatic cancer has been studied since several years. Although many molecular markers have been identified, it is evident that diagnostic and/or screening should be based on a set of tests rather than relying on one universal molecular indicator. In our study, we have obtained reproducible results indicating a notable capture rate of pancreatic cancers by using a combination of multiple highly specific markers. As shown in Table 1, test for KRAS mutation exhibited the highest possible specificity. Our finding is in agreement with reports of KRAS testing in pancreatic juice (sensitivity of 40%–89% and

specificity 33%–96%). With regard to KRAS testing in FNA samples, our sensitivity was similar to a recent study (70% vs 74%), moreover, at the same time we have confirmed 100% specificity of KRAS test in FNA reported in the same study^[32]. The fidelity of KRAS test in our work was followed by LOH analysis for the detection of allelic losses at 9p and 18q chromosomal positions (Tables 2 and 3). Satisfactory sensitivity with relatively low specificity of all above mentioned genetic tests make them suitable for screening purposes rather than for differential diagnosis of pancreatic masses.

As expected, the LOH analysis greatly profitted from laser microdissection of tumor cells from FNA-cytology specimens. In comparison to manual dissection from resected tissue, the sensitivity for detection of allelic loss was higher for laser-microdissected FNA samples. Low diagnostic value of *p53* and *p16* point mutations is in agreement with the overall limits of sensitivity and specificity intervals for these markers being previously tested in pancreatic juice^[18,25,28-30]. Similarly in FNA samples, *p53* or *p16* mutations seem suitable for differential diagnosis or screening in FNA samples.

Based on the observations from this study, a diagnostic algorithm reflecting the most efficient approach to distinguish pancreatic cancer from chronic pancreatitis in FNA samples can be constructed (Figure 3). As the EUS-guided FNA-cytology still has the highest diagnostic relevance reaching 100% both predictive values while showing acceptable sensitivity and specificity, it should always remain a preferred method of choice for examination of a focal pancreatic mass (Figure 3, step 1). Only a subset of FNA-inconclusive samples should be further examined by genetic analyses. The size of such sample set will undoubtedly depend on the pathologist's level of expertise. Of the various markers, KRAS is a prime candidate for first-level genetic analysis as the KRAS positivity showed to reliably differentiate patients with malignancy (Figure 3, step 2). Because of a lower sensitivity of KRAS test, samples negative for KRAS mutation should, consequently, be examined for

allelic losses by LOH tests. Due to its higher sensitivity, LOH on the chromosome 9p, should be tested first (Figure 3, step 3), followed by a final testing of the LOH 18q performed on the remaining samples showing negativity for all previous tests (Figure 3, step 4). Such a set of four subsequent testing steps delivers satisfactory results. When using to process data acquired in our study, malignancy was correctly assigned to all patients with ultimately confirmed cancer status with no false negatives. One patient with chronic pancreatitis was incorrectly assigned with pancreatic cancer, a false positive, due to positivity of both 9p and 18q LOH tests.

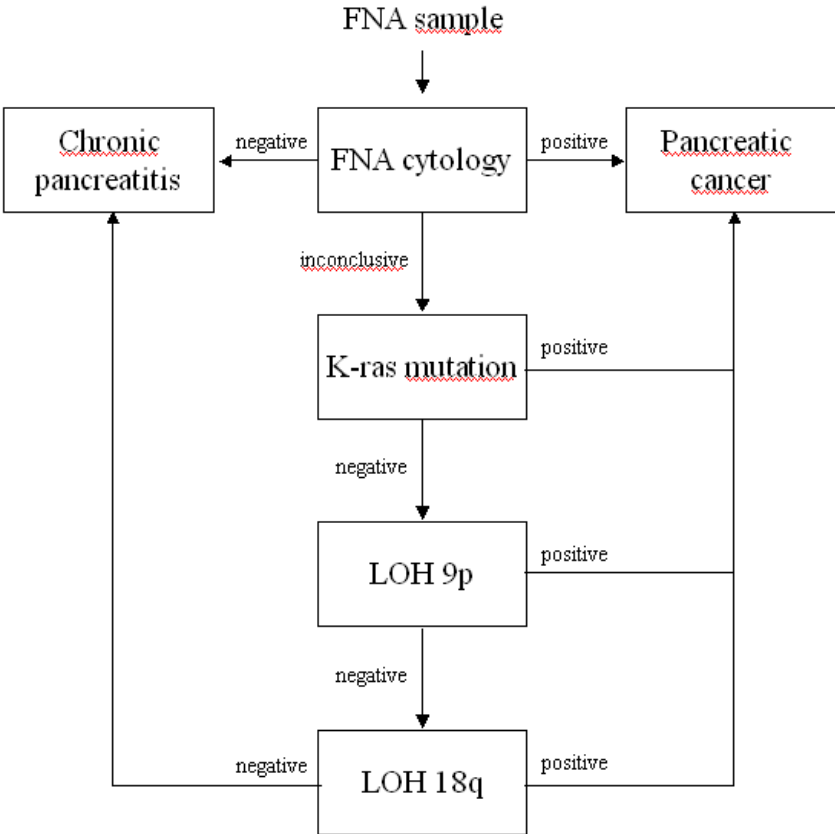


Figure 3 Four-step diagnostic algorithm evaluating FNA cytology and genetic changes for differentiation between benign and malignant lesions of the pancreas.

In conclusion, the most sensitive genetic test for screening for malignancy in EUS-guided FNA samples from pancreatic mass seems a combination of KRAS mutation analysis with detection of *p16* gene loss by LOH at 9p. Combination of KRAS with LOH analysis at both *p16* and DPC4 genes further improves the sensitivity to 96%. The best compromise of sensitivity and specificity according to the Youden's index is single KRAS (70%) or combination of KRAS with LOH 9p (57%). Based on our observations it seems that due to relatively high specificity of the used markers, malignancy is usually indicated already by a single positive test. Therefore, only negative samples are subsequently tested by further markers, increasing the cost effectivity of such diagnostic testing.

ACKNOWLEDGEMENT

Supported by Internal Grant Agency of the Ministry of Health, Czech Republic, No. 8027-3

REFERENCES

- 1 Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1999, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1973_1999/, 2002.
- 2 Gudjonsson B. Survival statistics gone awry. Pancreatic cancer, a case in point. *J Clin Gastroenterol* 2002;35:180-184
- 3 Wong T, Howes N, Threadgold J, Smart HL, Lombard MG, Gilmore I, Sutton R, Greenhalf W, Ellis I, Neoptolemos JP. Molecular diagnosis of early pancreatic ductal adenocarcinoma in high-risk patients. *Pancreatology* 2001;1:486-509
- 4 Jimeno A, Hidalgo M. Molecular biomarkers: their increasing role in the diagnosis, characterization, and therapy guidance in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5:787-796
- 5 Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2969-2972
- 6 Biankin AV, Kench JG, Dijkman FP, Biankin SA, Henshall SM. Molecular pathogenesis of precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathology* 2003;35:14-24
- 7 Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988;53:549-554
- 8 Hermanova M, Lukas Z, Nenutil R, Brazdil J, Kroupova I, Kren L, Pazourkova M, Ruzicka M, Dite 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
- 9 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
- 10 Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4: a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996;271:350-353
- 11 Malumbres M, Pellicer A. Ras pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 1998;3:887-912
- 12 Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53
- 13 Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redstone MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTSI) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994;8:27-32
- 14 Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J* 2000;19:1745-1754
- 15 Urban T, Ricci S, Grange JD, Lacave R, Boudghene F, Breitmayer F, Languille O, Roland J, Bernaudin JF. Detection of c-Ki-ras mutation by PCR/RFLP analysis and diagnosis of pancreatic adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:2008-2012
- 16 Volmar KE, Vollmer RT, Jowell PS, Nelson RC, Xie HB. Pancreatic FNA in 1000 cases: a comparison of imaging modalities. *Gastrointest Endosc* 2005;61:854-861
- 17 Hruban RH, Petersen G, Ha PK, Kern SE. Genetics of pancreatic cancer. From genes to families. *Surg Clin North Am* 1998;7:1-23
- 18 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
- 19 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
- 20 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
- 21 van Laethem JL, Vertongen P, Deviere J, van Rempelbergh 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
- 22 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
- 23 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

- 24 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
- 25 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
- 26 Watanabe H, Yamaguchi Y, Ha A, Hu YX, Motoo Y, Okai T, Yoshimura T, Sawabu N. Quantitative determination of K-ras mutations in pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer using hybridization protection assay. *Pancreas* 1998;17:341-347
- 27 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
- 28 Fukushima N, Walter KM, Uek T, Sato N, Matsubayashi H, Cameron JL, Hruban RH, Canto M, Yeo CJ, Goggins M. Diagnosing pancreatic cancer using methylation specific PCR analysis of pancreatic juice. *Cancer Biol Ther* 2003;2:78-83
- 29 Klump B, Hsieh CJ, Nehls O, Dette S, Holzmann K, Kiesslich R, Jung M, Sinn U, Ortner M, Porschen R, Gregor M. Methylation status of p14ARF and p16INK4a as detected in pancreatic secretions. *Br J Cancer* 2003;88:217-222
- 30 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
- 31 Fukushige S, Furukawa T, Satoh K, Sunamura M, Kobari M, Koizumi M, Horii A. Loss of chromosome 18q is an early event in pancreatic ductal tumorigenesis. *Cancer Res* 1998;58:4222-4226
- 32 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
- 33 Minarik M, Minarikova L, Bjorheim J, Ekstrom PO. Cycling gradient capillary electrophoresis: a low-cost tool for high-throughput analysis of genetic variations. *Electrophoresis* 2003;24:1716-1722
- 34 Minarik M, Minarikova L, Hrabikova M, Minarikova 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
- 35 Kristensen AT, Bjorheim J, Minarik M, Giercksky KE, Ekstrom PO. Detection of mutations in exon 8 of TP53 by temperature gradient 96-capillary array electrophoresis. *Biotechniques* 2002;33:650-653
- 36 Attri J, Srinivasan R, Majumdar S, Radotra BD, Wig J. Alterations of tumor suppressor gene p16INK4a in pancreatic ductal carcinoma. *BMC Gastroenterol* 2005;5:22
- 37 Gu K, Mes-Masson AM, Gauthier J, Saad F. Analysis of the p16 tumor suppressor gene in early-stage prostate cancer. *Mol Carcinog* 1998;21:164-170
- 38 Trkova M, Babjuk M, Duskova J, Benesova-Minarikova L, Soukup V, Mares J, Minarik M, Sedlacek Z. Analysis of genetic events in 17p13 and 9p21 regions supports predominant monoclonal origin of multifocal and recurrent bladder cancer. *Cancer Lett* 2006;242:68-76
- 39 Lassus H, Salovaara R, Aaltonen LA, Butzow R. (2001): Alelic analysis of serous ovarian carcinoma reveals two putative tumor suppressor loci at 18q22-q23 distal to SMAD4, SMAD2, and DCC. *American Journal of Pathology* 2001;159:35-42
- 40 Dewitt J, Devereaux BM, Lehman GA, Sherman S, Imperiale TF. Comparison of endoscopic ultrasound and computed tomography for the preoperative evaluation of pancreatic cancer: a systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:717-725
- 41 Chang KJ. State of the art lecture: endoscopic ultrasound (EUS) and FNA in pancreatobiliary tumors. *Endoscopy* 2006;38 Suppl 1:S56-60 [PMID: 16802226]
- 42 Robins DB, Katz RL, Atkinson EN, Green L. Fine needle aspiration of the pancreas. In quest of accuracy. *Acta Cytol* 1995;39:1-10

Mutation status of K-ras, p53 and allelic losses at 9p and 18q are not prognostic markers in patients with pancreatic cancer

Cyril Šálek^{1,2}, Petra Mináriková², Lucie Benešová¹, Vladimír Nosek², Robin Strnad³, Miroslav Zavoral², Marek Minárik¹

- (1) Laboratory for Molecular Genetics and Oncology, Genomac International Ltd., Prague, Czech Republic
- (2) Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, Central Military Hospital and 1st Medical Faculty of Charles University, Prague, Czech Republic
- (3) Department of Surgery, Central Military Hospital and 2nd Medical Faculty of Charles University, Prague, Czech Republic

**Anticancer Research 2009; accepted for publication
IF 1,414**

ABSTRACT

Background: KRAS mutations and allelic losses of tumor suppressors *p16* and DPC4 are perceived as potential markers for screening of pancreatic malignancy. In this study, we compare molecular data with survival statistics of the patients and question whether they correlate with patients' prognosis.

Patients and Methods: 53 consecutive patients with advanced pancreatic cancer (stage III and IV) who underwent EUS-guided fine needle aspiration (FNA) were enrolled into the study (28 males, 25 females, 63±10.5 years). Samples were evaluated on-site for presence of malignant cells. DNA was extracted from Giemsa stained smears using laser microdissection, and mutation status of KRAS and *p53* was tested by cycling-gradient capillary electrophoresis (CGCE). 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 loci. Molecular data were compared with survival statistics using Kaplan-Meier method.

Results: 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: None of the studied molecular markers was identified as an independent factor determining survival prognosis.

Introduction:

Pancreatic cancer (PC) is considered one of the most lethal tumors of human digestive system. Despite a considerable progress in understanding molecular background of pancreatic carcinogenesis in the last decade as well as novel diagnostic and therapeutic approaches, survival rates of patients remains generally poor [1]. Mortality of the disease is almost at the level of its incidence as the majority of cases is diagnosed in advanced, unresectable stage [2].

The development of pancreatic cancer follows a distinct path from normal ductal epithelia, pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN I–III) up to the carcinoma [3,4]. This path is accompanied by sequential accumulation of genetic changes (mostly point mutations, gene amplifications and allelic deletions). An early event in pancreatic carcinogenesis is activation of KRAS oncogene by somatic point substitution [5]. This alteration can be detected already in PanIN-1A lesions as well as in chronic pancreatitis and therefore represents an independent risk factor for pancreatic cancer. In advanced pancreatic cancer, KRAS mutation is found in close to 90% of cases, therefore considered as a potential molecular marker for early detection of PC. Following the initial KRAS activation, a number of other genetic abnormalities take place. PanIN-1A and PanIN-1B phases are characterized by overexpression of HER-2/neu oncogene, which is found in 50% of pancreatic neoplasms. Increased HER-2/neu expression, however, is a result of higher transcription rate rather than gene amplification, rendering HER-2/neu not a good therapeutic target [6]. Aside from the above oncogenes, there is a number of tumor suppressor genes affected by genetic alterations during the PC transformation process. Among them, *p16* tumor-suppressor (also referred to as CDKN2 or INK4), located at chromosome 9p21 is inactivated already in transition from PanIN-1B to PanIN-2 phases [7]. Furthermore deletion of another important tumor-suppressor gene, SMAD4 (known also as deleted in pancreatic carcinoma, DPC4), located at chromosome 18q21 has also been observed [8]. Consequently, the *p16* and DPC4 are

inactivated in almost 95% (55% respectively) of cases of invasive PC, therefore also represent a suitable molecular markers.

The above mentioned genetic changes substantially affect control of the cell cycle, thus enabling defected cells to proliferate. Oncogene KRAS encodes for GTP-binding protein responsible for signaling in MAP-kinase pathway of intracellular signal transduction [9]. Tumor suppressor gene *p53* is translated into a product that regulates transcription of other regulatory proteins, such as p21, that are potent inducers of apoptosis in response to severe DNA damage. It exerts its regulatory activity at the G1/S interface of the cell cycle [10]. The product *p16* tumor suppressor binds to the complex of cyclinD/CDK4 or CDK6, and thus regulates progression of cell cycle at the G1 control point [11]. Finally, the DPC4 tumor suppressor, a member of SMAD protein family, exerts its function via TGF- β signalling pathway and inhibits cell cycle progression by introducing G1 arrest [12]; it also regulates angiogenesis [13].

From the above progression model it is clear that the pancreatic malignant conversion comes from a combination of multiple genetic events rather than originating from a single mutation [14]. Accordingly, no single molecular marker useable for diagnosis of early stage of the disease was identified. Given the inherent heterogeneity of the carcinogenic pathways, simultaneous examination of multiple markers should lead to improved testing efficacy. Therefore, it is gene microarray and protein profiling techniques that are in hope to unveil significant genetic key for early diagnosis, prediction of prognosis, and estimate of the responsiveness to chemotherapy [15].

In our recent study [16], we have attempted to determine diagnostic potential of molecular changes in KRAS, *p53*, *p16* and DPC4. We have examined 101 patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer who underwent endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration biopsy (FNA). Sensitivity and specificity of separate molecular markers was

70% and 100% for KRAS ($P<0.001$), 24% and 90% for *p53* (NS), 85% and 64% for LOH at 9p ($P<0.001$), and 78% and 57% for LOH at 18q respectively ($P<0.05$). In search for an optimum combination of molecular markers of pancreatic malignancy we found that screening for KRAS mutations along with loss of heterozygosity (LOH) at chromosomes 9p and 18q (sites of tumor suppressor genes *p16* and *DPC4*) is a sensitive test of PC in patients with inconclusive finding on FNA cytology.

In this paper, we extend the scope further to question the relevance of KRAS and *p53* mutation status as well as LOH at 9p and 18q as prognostic factors for disease survival. In addition, we evaluate correlation of the above molecular factors to the appearance of the tumor in endoscopic ultrasound (EUS) and/or serum levels of tumor markers CA 19-9 and CEA.

Patients and Methods:

Subjects

A total of 57 consecutive patients with advanced pancreatic cancer (stage III and IV according to WHO classification [17]) who underwent EUS-guided fine needle aspiration (FNA) were enrolled into the study. The diagnosis was proven by FNA cytology and histology of surgical specimen and/or long term follow-up. Five patients were excluded due to other diagnosis (adenoma, malignant fibrous histiocytoma, endocrine tumor, cholangiogenic carcinoma), or for malignant duplicity (a patient with breast carcinoma).

Of the 53 patients there was a total of 28 (53%) males and 25 (47%) females. The mean age in the group was 63 ± 10.5 years, range 40–84 years ($+1.95/-2.25$ standard deviation). All patients signed informed consent with participation in the study as well as with genetic analysis of their tissue material.

Methods

Evaluation of CA 19-9 and CEA serum levels was undertaken prior to invasive endoscopy (Table 1). EUS was performed by single experienced endoscopist using GFUM-20 radial and GFUCT-140 linear array scanning echoendoscopes (Olympus Europe) (Table 2). FNA samples were stained using the rapid Hematoxylin and Eosin (H&E) staining technique, and evaluated by on-site cytologist to ensure that the potential tumor cells are present in the smears. Definitive FNA diagnosis was stated by a single pathologist, blinded to the EUS, after staining remaining samples by Giemsa. The same samples were subsequently submitted for genetic analysis. Laser microdissection of Giemsa-stained cells was performed on P.A.L.M. Microlaser instrument (Carl Zeiss, Germany). Normally, between 100 and 200 cells were dissected from each slide. Genomic DNA was extracted from the dissected cells by a spin-column extraction protocol using JetQuick Tissue DNA Isolation Kit (GENOMED GmbH, Loehne, Germany).

Table 1. Serum Tumor Markers

CA 19-9	
normal	9 (26 %)
high	26 (74 %)
TOTAL	35 (100 %)
CEA	
normal	27 (82 %)
high	6 (18 %)
TOTAL	33 (100 %)

Note: normal serum level for CA 19-9 is 0–37 U/ml; normal serum level for CEA is 0–5.1 µg/l.

Presence of somatic point mutations in codons 12 and 13 of KRAS and in exons 5–8 of *p53* was detected by GenoScan (Genomac, Prague, CZ), a high-sensitivity mutation detection kit based on heteroduplex analysis in temperature gradient (Table 3) [18]. Briefly, a PCR amplification of the target sequence containing the mutation hotspots was performed

Table 2. EUS Characteristics of the Tumors

tumor location	
head	43 (81 %)
body	7 (13 %)
tail	3 (6 %)
tumor size	
mean	33 ± 11 cm
range	5–60 cm (+2.4/-2.5 standard deviation)
infiltrative growth	
yes	44 (83 %)
no	9 (17 %)
cystic component	
yes	8 (15 %)
no	45 (85 %)
duct dilatation	
yes	41 (77 %)
no	12 (23 %)
angioinvasion	
yes	24 (45 %)
no	29 (55 %)
pathological lymph nodes	
yes	51 (96 %)
no	2 (4 %)
EUS signs of chronic pancreatitis	
yes	6 (11 %)
no	47 (89 %)
TOTAL	53 (100 %)

Table 3. Molecular Status

KRAS	
mutated	36 (68 %)
non-mutated	17 (32 %)
TOTAL	53 (100 %)
p53	
mutated	13 (25 %)
non-mutated	40 (75 %)
TOTAL	53 (100 %)
LOH 9p	
LOH found	27 (79 %)
LOH not found	7 (21 %)
TOTAL	34 (100 %)
LOH 18q	
LOH found	24 (75 %)
LOH not found	8 (25 %)
TOTAL	32 (100 %)

with one of the primers fluorescently labeled and the other primer extended by a 40 bp artificial high-melting domain (GC-clamp). Following PCR, the 100–140 bp fragment was heated and slowly cooled to allow formation of homo- and heteroduplex forms upon re-annealing of wildtype and mutant sequences. The resulting double-stranded fragments were subjected to capillary-electrophoretic separation at a cycling temporal temperature gradient.

Allelic losses at chromosomal positions 9p and 18q were uncovered by the loss of heterozygosity (LOH) analysis using a total of 3 microsatellite (STR) markers for 9q (D9S157, D9S171 and D9S1748) and 2 markers for 18q (D18S363 and D18S474) (Table 3) [19,20].

All capillary electrophoretic experiments including previously described temperature-gradient and fragment analysis were performed on a capillary-array DNA sequencer (MegaBACE™ 1000, GE Healthcare, Piscataway, NJ) equipped with Caddy™ 1000 robotic sample loader (Watrex Praha, Prague, Czech Republic) for unattended overnight operation.

Statistical analysis

Survival statistics was calculated by estimation of Kaplan-Meier survival function and Mantel-Cox test for testing the equality of survival curves. Molecular data were compared with survival statistics by chi-square test in two-way frequency tables with Yate's correction, where appropriate.

Results:

The mean survival in KRAS positive group was 8.4 ± 1.3 months (95% CI 5.9–10.9), in KRAS negative group 8.3 ± 1.2 months (95% CI 5.9–10.7). The median survival was 7.0 ± 2.4 months (95% CI 2.3–11.7) in KRAS positives and 10.0 ± 0.6 months (95% CI 8.7–11.3) in KRAS

negatives. There was no statistically significant difference in survival of the two groups ($P=0.636$).

The mean survival in *p53* positive group was 11.5 ± 2.6 months (95% CI 6.4–16.7), in *p53* negative group 7.5 ± 0.9 months (95% CI 5.6–9.3). The median survival was 10.0 ± 2.2 months (95% CI 5.6–14.4) in *p53* positives and 6.0 ± 2.5 months (95% CI 1.1–10.9) in *p53* negatives. The difference was statistically significant ($P<0.05$).

The mean survival in LOH 9p positive group was 8.8 ± 1.5 months (95% CI 5.9–11.8), in LOH 9p negative group 7.4 ± 2.4 months (95% CI 2.8–12.1). The median survival was 9.0 ± 5.1 months (95% CI 0–18.9) in LOH 9p positives and 10.0 ± 5.0 months (95% CI 0.2–19.8) in LOH 9p negatives. There was no statistically significant difference in survival of the two groups ($P=0.509$).

The mean survival in LOH 18q positive group was 9.6 ± 1.6 months (95% CI 6.4–12.7), in LOH 18q negative group 6.6 ± 2.2 months (95% CI 2.2–10.9). The median survival was 10.0 ± 4.2 months (95% CI 1.8–18.2) in LOH 18q positives and 3.0 ± 1.3 months (95% CI 0.5–5.5) in LOH 18q negatives. There was no statistically significant difference in survival of the two groups ($P=0.311$).

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 suffering from pancreatic cancer (Table 4, Figure 1–4).

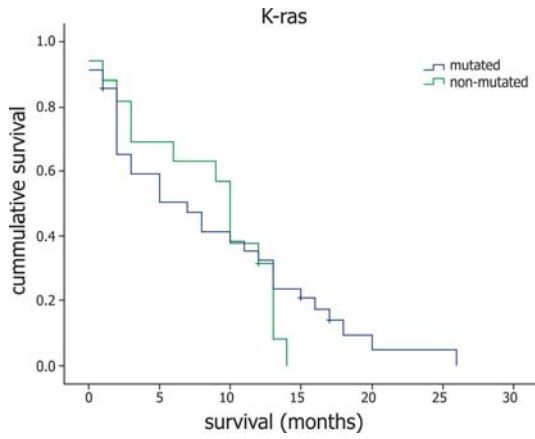


Figure 1. Kaplan-Meier curves of the overall survival based on KRAS mutation status.

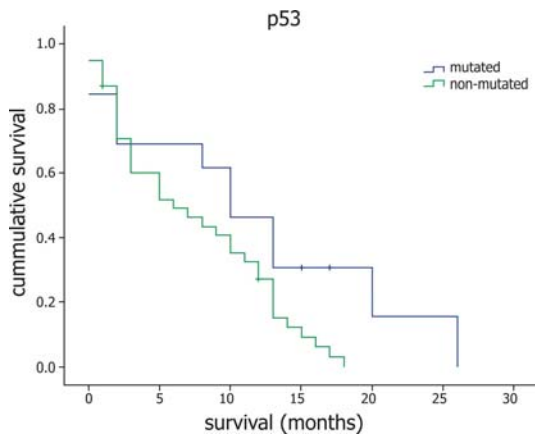


Figure 2. Kaplan-Meier curves of the overall survival based on *p53* mutation status.

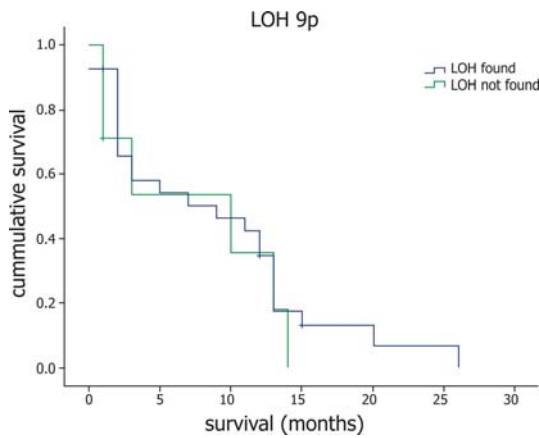


Figure 3. Kaplan-Meier curves of the overall survival with regard to LOH at chromosome 9p (site of *p16*).

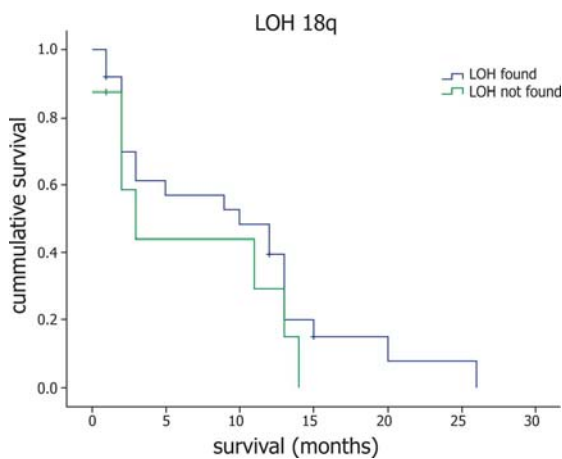


Figure 4. Kaplan-Meier curves of the overall survival with regard to LOH at chromosome 18q (site of *DPC4*).

Table 4. Survival Analysis According to the Molecular Status

	mean survival		median survival		<i>P</i>	Cox regression <i>P</i>
	months	standard error	months	standard error		
KRAS						
positive	8.4	± 1.3	7.0	± 2.4	0.636 (NS)	0.941 (NS)
negative	8.3	± 1.2	10.0	± 0.6		
TOTAL	8.5	± 1.0	8.0	± 2.0		
p53						
positive	11.5	± 2.6	10.0	± 2.2	0.045	0.132 (NS)
negative	7.5	± 0.9	6.0	± 2.5		
TOTAL	8.5	± 1.0	8.0	± 2.0		
LOH 9p						
positive	8.8	± 1.5	9.0	± 5.1	0.509 (NS)	0.830 (NS)
negative	7.4	± 2.4	10.0	± 5.0		
TOTAL	8.5	± 1.3	9.0	± 4.9		
LOH 18q						
positive	9.6	± 1.6	10.0	± 4.2	0.311 (NS)	0.616 (NS)
negative	6.6	± 2.2	3.0	± 1.3		
TOTAL	8.8	± 1.3	10.0	± 5.4		

As a secondary aim, possible correlation between occurrence of gene mutations and EUS image of tumors and/or levels of serum tumor markers CA 19-9 and CEA was questioned (Table 5). There was no difference in overall survival of patients with tumors < 30 mm and ≥ 30 mm. No correlation between tumor size and frequency of gene mutations and/or serum levels of CA 19-9 and CEA was found. EUS signs of angioinvasion, infiltrative growth pattern and cystic component were not independent prognostic factors regarding overall survival, neither they correlated with frequency of gene mutations and/or serum levels of CA 19-9 and CEA was found. No difference in overall survival of patients with and without EUS signs of chronic pancreatitis was observed. However, absence of chronic inflammatory changes in EUS correlated with high frequency of LOH at 18q (site of DPC4) ($P<0.05$). Statistically significant correlation between EUS signs of chronic pancreatitis and high serum CEA was detected ($P<0.05$). All patients with EUS signs of chronic pancreatitis passed within 10 months (NS).

Table 5. Correlation of EUS Characteristics with Molecular Status and Serum Levels of CA 19-9 and CEA

tumor size		< 30 mm	≥ 30 mm	P
mean survival (months)		7.7	8.5	NS
KRAS	mutated	73 %	66 %	NS
	not mutated	27 %	34 %	
p53	mutated	33 %	21 %	NS
	not mutated	67 %	79 %	
LOH 9p	yes	80 %	79 %	NS
	no	20 %	21 %	
LOH 18q	yes	60 %	78 %	NS
	no	40 %	22 %	
CA 19-9	normal	44 %	19 %	NS
	high	56 %	81 %	
CEA	normal	78 %	83 %	NS
	high	22 %	17 %	

angioinvasion		yes	no	P
mean survival (months)		7.8	8.7	NS
KRAS	mutated	67 %	69 %	NS
	not mutated	33 %	31 %	
p53	mutated	21 %	28 %	NS
	not mutated	79 %	72 %	
LOH 9p	yes	82 %	77 %	NS
	no	18 %	23 %	
LOH 18q	yes	75 %	75 %	NS
	no	25 %	25 %	
CA 19-9	normal	33 %	20 %	NS
	high	67 %	80 %	
CEA	normal	79 %	84 %	NS
	high	21 %	16 %	

infiltrative growth		yes	no	P
mean survival (months)		8.3	8.9	NS
KRAS	mutated	66 %	78 %	NS
	not mutated	34 %	22 %	
p53	mutated	23 %	33 %	NS
	not mutated	77 %	67 %	
LOH 9p	yes	79 %	83 %	NS
	no	21 %	17 %	
LOH 18q	yes	77 %	67 %	NS
	no	23 %	33 %	
CA 19-9	normal	28 %	17 %	NS
	high	72 %	83 %	
CEA	normal	86 %	60 %	NS
	high	14 %	40 %	

cystic component		yes	no	P
	mean survival (months)	7.7	8.4	NS
KRAS	mutated	75 %	68 %	NS
	not mutated	25 %	32 %	
<i>p53</i>	mutated	0 %	29 %	NS
	not mutated	100 %	71 %	
LOH 9p	yes	80 %	82 %	NS
	no	20 %	18 %	
LOH 18q	yes	75 %	78 %	NS
	no	25 %	22 %	
CA 19-9	normal	0 %	29 %	NS
	high	100 %	71 %	
CEA	normal	60 %	85 %	NS
	high	40 %	15 %	

EUS signs of chronic pancreatitis		yes	no	P
	mean survival (months)	5.0	8.8	NS
KRAS	mutated	67 %	68 %	NS
	not mutated	33 %	32 %	
<i>p53</i>	mutated	17 %	25 %	NS
	not mutated	83 %	75 %	
LOH 9p	yes	60 %	83 %	NS
	no	40 %	17 %	
LOH 18q	yes	40 %	82 %	< 0.05
	no	60 %	18 %	
CA 19-9	normal	0 %	30 %	NS
	high	100 %	70 %	
CEA	normal	40 %	89 %	< 0.05
	high	60 %	11 %	

Discussion:

KRAS is a specific marker of PC with prevalence estimated to reach 90%–95% [3,5]. Its activation by somatic point mutation occurs early in pancreatic carcinogenesis, however, most papers published in recent years failed to prove its association with patient prognosis. Kawecha did not find any overall association with survival in the group of 157 patients following resection, however, there was a significant difference in survival according to the type of KRAS mutation [21]. The clinical potential of KRAS consists in differentiating

benign from malignant lesions in EUS-FNA samples rather than in estimating patients' prognosis [22].

Although majority of studies proved that there is no association between *p53* mutation status and patient survival, some scholars found significant correlation of *p53* mutation with decreased survival [23-27]. Surprisingly, our results initially indicated an opposite correlation when the group with mutated *p53* demonstrated significantly higher survival than the non-mutated group. After adjustment for age, however, no significant correlation between *p53* mutation status and survival was found.

Loss of *p16* expression appears to be an early event in pancreatic carcinogenesis; it is described in up to 98% of PC [28]. Genetic mechanisms underlying defected expression of *p16* are not only point mutations and allelic deletions, but also aberrant promoter methylation by which epigenetic mechanisms may contribute to pancreatic oncogenesis [29,30]. Majority of published papers have proven its association with decreased survival as well as advanced stage of the disease [31]. In our study, however, in none of the cases LOH at particular chromosomal site correlated with the survival, neither did additional testing of *p16* somatic mutations (data not shown). It appears that other mechanisms, e.g. epigenetic inactivation, may play a more significant role in case of the *p16* gene.

Aberrant expression of DPC4 gene was described in 55% of PC. As noted above, it is a late event in the process of PC development. Results published on DPC4 as a potential prognostic marker in PC are conflicting. It seems logical that preserved DPC4 expression would correlate with longer survival, as Tascilar has shown in patients after surgical resection [32], however, other papers failed to confirm this. Yatsuoka studied LOH at selected chromosomal loci in association with clinicopathological features of patients; LOH 18q was

identified as a marker of poor prognosis [33]. In our cohort, no correlation between LOH at site of DPC4 gene and patient survival was found. It has been shown that LOH at the DPC4 locus may not be an obligatory event in SMAD4-dependent tumorigenesis [34]. The prognostic relevance of loss of DPC4 function is equivocal, on the other hand, preserved DPC4 expression is correlated with better prognosis of the patients with PC [35].

Serum glycosylation marker CA 19-9 is commonly accepted antigen to assess prognosis and monitor response to therapy [36]. However, it is not recommended for diagnostic purposes [37]. In our cohort, no correlation between value of CA 19-9 at time of diagnosis and survival was observed. The fact that elevation of CA 19-9 is dependant on tumor differentiation and extent of PC makes this marker unsuitable for detecting small and early tumors [38,39,40]. Its prognostic significance was examined by the following cut off values: preoperative value of less than 200 U/ml, decrease in CA 19-9 level after surgery, or significant reduction in CA 19-9 levels after chemotherapy [41,42]. The problematic use of CA 19-9 in clinical praxis is also potentiated by the fact that 5–14% of the population is unable to synthesise CA 19-9 as they lack the Lewis antigen glycosyltransferase [43].

Spotlights in biomarkers are now directed on other molecules, such as previously known mucines. Using novel immunoassay, MUC-1 was shown to be superior to CA 19-9 in distinguishing cancer from normal and even from pancreatitis [44]. MUC-4, abnormally glycosylated tumor-associated mucin, was detected in tumor samples and cell lines, whereas it was negative in chronic pancreatitis and normal pancreas tissues [45]. Its value in clinical settings is, however, to be questioned.

In conclusion, none of the studied molecular markers was identified as a prognostic marker in our study. In light of conflicting results reported in the literature, such finding only further highlights a complexity of the pancreatic carcinogenesis, its interaction with cytostatic therapy agents as well as other exogenous effects yet to be uncovered. The genetic predetermination of the pancreatic cancer susceptibility on one hand and the therapy response on the other define the patients' overall survival. In the era of expression profiling techniques and whole genom scans, new biomarkers complementary to the existing DNA variations are to be unveiled. Only reliable markers (or multiple marker combinations) based on interactions between various signaling pathways will enable development of sensitive diagnostic tests for patients with suspicious pancreatic malignancy. In addition, such tools may also be applied to accurately estimate prognosis, and to identify candidates for chemotherapeutic agents as well as targeted biological or gene therapies.

Acknowledgement:

Authors thank to Jelena Skibová and Dr. Kateřina Benešová for their substantial help with statistical analysis. This project was supported by Internal Grant Agency of the Ministry of Health, Czech Republic, No. NR/8027-3.

REFERENCES

- 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 Gudjonsson B. Survival statistics gone awry. Pancreatic cancer, A case in point. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 180-4.
- 3 Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer, *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2969–2972.
- 4 Biankin AV, Kench JG, Dijkman FP, Biankin SA, Henshall SM. Molecular pathogenesis of precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathology* 2003; 35(1): 14–24.
- 5 Deramaudt T, Rustgi AK. Mutant KRAS in the initiation of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756: 97–101.
- 6 Hermanova M, Lukas Z, Nenutil R, Brazdil J, Kroupova I, Kren L, Pazourkova M, Ruzicka M, Dite 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.
- 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 Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006; 441: 424–430.
- 10 Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 2008; 27: 6507–6521.
- 11 Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 731–737.
- 12 Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000; 19: 1745–54.
- 13 Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W. Smad4 transcriptional pathways and angiogenesis. *Int J Gastrointest Cancer* 2002; 31(1–3): 47–59.
- 14 Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer, *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2969–2972.
- 15 Jimeno A, Hidalgo M. Molecular biomarkers: their increasing role in the diagnosis, characterization, and therapy guidance in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* 2006 Apr;5(4):787–796.
- 16 Salek C, Benesova L, Zavoral M, Nosek V, Kasperova L, Ryska M, Strnad R, Traboulsi E, Minarik M. Evaluation of 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.
- 17 AJCC Cancer Staging Handbook. 6th Edition. New York : Springer Verlag, 2002.
- 18 Minarik M, Minarikova L, Bjorheim J, Ekstrom PO. Cycling gradient capillary electrophoresis: a low-cost tool for high-throughput analysis of genetic variations. *Electrophoresis* 2003; 24: 1716–1722.
- 19 Trkova M, Babjuk M, Duskova J, Benesova-Minarikova L, Soukup V, Mares J, Minarik M, Sedlacek Z. Analysis of genetic events in 17p13 and 9p21 regions supports predominant monoclonal origin of multifocal and recurrent bladder cancer. *Cancer Lett* 2006; 242, 68–76.
- 20 Lassus H., Salovaara R., Aaltonen L. A., Butzow R. (2001): Allelic Analysis of Serous Ovarian Carcinoma Reveals Two Putative Tumor Suppressor Loci at 18q22-q23 Distal to SMAD4, SMAD2, and DCC. *American Journal of Pathology*, Vol. 159, No. 1: 35–42.
- 21 Kawesha A. Ghaneh P, Andrén-Sandberg A, Ograed D, Skar R, Dawiskiba S., Evans JD, Campbell F, Lemoine N, Neoptolemos JP. K-ras oncogene subtype mutations are associated with survival but not expression of p53, p16(INK4a), p21(WAF-1), cyclin D1, erbB-2 and erbB-3 in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2000; 89(6): 469–474.
- 22 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.
- 23 Talar-Wojnarowska R, Gasiorowska A, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Strzelczyk J, Janiak A, Malecka-Panas E. Comparative evaluation of p53 mutation in pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2006; 53(70): 608–612.
- 24 Jeong J, Park YN, Park JS, Yoon DS, Chi HS, Kim BR. Clinical significance of p16 protein expression loss and aberrant p53 protein expression in pancreatic cancer. *Yonsei Med J.* 2005; 46(4): 516–525.

- 25 Dong M, Nio Y, Yamasawa K, Toga T, Yue L, Harada T. p53 alteration is not an independent prognostic indicator, but affects the efficacy of adjuvant chemotherapy in human pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 2003; 82(2): 111–120.
- 26 Ghaneh P, Kawesha A, Evans JD, Neoptolemos JP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2002; 9(1): 1–11.
- 27 Yokoyama M, Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Korc M. p53 expression in human pancreatic cancer correlates with enhanced biological aggressiveness. *Anticancer Res* 1994; 14: 2477–2483.
- 28 Schutte M, Hruban RH, Beradts 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.
- 29 Sato N, Goggins M. Epigenetic alterations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2006; 13: 280–285.
- 30 Sato N, Goggins M. The role of epigenetic alterations in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2006, 13: 286–295.
- 31 Ohtsubo K, Watanabe H, Yamaguchi Y, Hu YX, Motoo Y, Okai T, Sawabu N. Abnormalities of tumor suppressor gene p16 in pancreatic carcinoma: immunohistochemical and genetic findings compared with clinicopathological parameters. *J Gastroenterol* 2003; 38: 663–671.
- 32 Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, Sohn T, Wilentz RE, Offerhaus GJ, Adsay V, Abrams RA, Cameron JL, Kern SE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7(12): 3853–3856.
- 33 Yatsuoka T, Sunamura M, Furukawa T, Fukushima S, Yokoyama T, Inoue H, Shibuya K, Takeda K, Matsuno S, Horii A. Association of poor prognosis with loss of 12q, 17p, and 18q, and concordant loss of 6p/17p and 12q/18q in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(8): 2080–2085.
- 34 Weinstein M, Yang X, Deng CX. Functions of mammalian Smad genes as revealed by targeted gene disruption in mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 49–58.
- 35 Fang L. SMAD4/DPC4 and pancreatic cancer survival. *Clin Cancer Res* 2001, 7(12): 3853–3856.
- 36 Fry LC, Monkemuller K, Malfertheiner P. Molecular markers of pancreatic cancer: development and clinical relevance. *Langenbecks Arch Surg* 2008 [Epub ahead of print].
- 37 Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(33): 5313–27.
- 38 Goggins M. Molecular markers of early pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2005, 23: 4523–4531.
- 39 Jiang XT, Tao HQ, Zou SC. Detection of serum tumor markers in the diagnosis and treatment of patients with pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3: 464–468.
- 40 DiMagno EP, Reber HA, Tempero MA. AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma: American Gastroenterological Association. *Gastroenterology* 1999; 117: 1464–1484.
- 41 Ferrone CR, Finkelstein DM, Thayer SP, Muzikansky A, Fernandez-delCastillo C, Warshaw AL. Perioperative CA19-9 levels can predict stage and survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24(18): 2897–902.
- 42 Boeck S, Schulz C, Stieber P, Holdenrieder S, Weckbach S, Heinemann V. Assessing prognosis in metastatic pancreatic cancer by the serum tumor marker CA 19-9: pretreatment levels or kinetics during chemotherapy? *Onkologie* 2007; 30: 39–42.
- 43 Tempero MA, Uchida E, Takasaki H, Burnett DA, Steplewski Z, Pour PM. Relationship of carbohydrate antigen 19-9 as tumor marker in patients with pancreatic cancer. *Oncology* 1987; 70: 255–264.
- 44 Gold DV, Modrak DE, Ying Z, Cardillo TM, Sharkey RM, Goldenberg DM. New MUC1 serum immunoassay differentiates pancreatic cancer from pancreatitis. *J Clin Oncol* 2006; 24(2): 252–8.
- 45 Andrianifahanana M, Moniaux N, Schmied BM, Ringel J, Friess H, Hollingsworth MA, Büchler MW, Aubert JP, Batra SK. Mucin (MUC) gene expression in human pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a potential role of MUC4 as a tumor marker of diagnostic significance. *Clin Cancer Res* 2001 Dec; 7(12): 4033–4040.

4. SHRNUÍ A ZHODNOCENÍ CÍLŮ PRÁCE

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 % specificitu 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 specificita testů. Senzitivita a specificita pro test LOH v 9p lokusu jsou 85 % a 64 %, pro LOH v lokusu 18q jsou 78 % a 57%. Aplikace této metody na materiál FNA nebyl dosud v odborné literatuře publikován.

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 %, specificita 64 %). Rozšířením této kombinace o další genetický marker dojde o malé navýšení senzitivity, tento zisk je však významně kompromitován poklesem specificity.

Po zhodnocení výsledků této studie byl navržen diagnostický algoritmus, který kombinuje cytologické zhodnocení FNA nátěru s molekulárněgenetickými testy tak, aby byla minimalizována možnost falešně negativního nálezu při zachované senzitivitě. V prvním kroku navrhujeme 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:

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 Giemsy, vyšetřeny patologem a následně podstoupeny do molekulárněgenetické laboratoře. DNA byla izolována přímo ze suspektních buněk separovaných metodou laserové mikrodisekce.

Cytologické vyšetření aspirátu pankreatu získaného technikou tenkojehlové punkce pod endosonografickou kontrolou dosáhlo sensitivity 75 % a specificity 85 %. Pozitivní a negativní prediktivní hodnota byly 100 %. Pakliže patolog shledal buněčný nátěr jako hodnotitelný, neuzavřel žádný nález vzorku z maligní léze jako benigní a naopak. Podmínkou je předběžné zhodnocení aspirátu on-site cytologem bezprostředně po odběru materiálu na endoskopickém oddělení a zkušenost patologa, který se pravidelně věnuje pankreatické cytodiagnostice.

Histologické vyšetření chirurgického resektátu dosáhlo očekávaně nejvyšší senzitivity a specificity: 100 % a 95 %.

Schopnost endoskopické ultrasonografie jakožto nejsenzitivnější metody k posouzení lokoregionálního stagingu karcinomu pankreatu rozlišit mezi zánětlivou a maligní ložiskovou lézí pouze na základě endosonografického nálezu je limitovaná. V našem souboru bylo endosonografické vyšetření prováděno jedním zkušeným endoskopistou, senzitivita byla 79 %, specificita 77%, v 11 % případů se na základě endosonografického obrazu nebylo možné k pravděpodobnému původu léze vyjádřit.

Nebyla prokázána korelace mezi charakteristikami karcinomu pankreatu v endosonografickém obraze (velikost tumoru, známky angioinvaze, infiltrativní růst, přítomnost cystické složky, endosonografické známky chronické pankreatitidy) a spektrem genových mutací. Absence chronických zánětlivých změn v EUS obraze v korelaci s vyšší frekvencí alelických ztrát na 18. chromosomu v lokusu pro gen DPC4 byla na hranici statistické významnosti. Význam tohoto zjištění není jednoznačný, na délku přežití pacientů vliv nemá.



Diskrepance mezi objemem nových poznatků o molekulárněbiologické 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 stádia panreatické intraepiteliální neoplazie jsou doprovázena sekvenční akumulací genových variací, vedly na přelomu XX. a XXI.

století k optimistickému předpokladu, že genetické metody umožní diagnostikovat karcinom pankreatu v časných stádiích choroby, kdy bude možné radikálně terapeuticky zasáhnout, a tím zlepšit nepříznivé statistiky přežití nemocných. Bohužel, biologická povaha onemocnění, zprvu asymptomatický průběh, jeho rychlá progresse a včasné zakládání mikrometastáz neumožňují časný karcinom pankreatu klinicky definovat. Ani molekulárněgenetické metody dosud nepřinesly zásadní průlom v chápání časného karcinomu pankreatu. Studium PanIN lézí je z tohoto hlediska nedostatečné, neboť se zpravidla vyskytují i na periférii invazivního karcinomu pankreatu a jejich identifikace v tkáni rizikových pacientů (například s chronickou pankreatitidou) je možná jen po resekcčním 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.

5. 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.

6. 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 Gastroenterologica et Hepatologica, 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., Maaloufova J., Valova 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*. Transfúze 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, Loket 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 biomedicínském výzkumu, 2. 2. - 6. 2. 2004 (prof. Zvárová)
- Pokroky v biologii buňky, 8. 2. - 29. 3. 2005 (prof. Raška)