

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Lékařská fakulta

**Stanovení exprese CEA, EGFR a
hTERT v peritoneální laváži u
pacientů s adenokarcinomem
pankreatu.**

Doktorská dizertační práce

MUDr. Mohamed Ghothim

OLOMOUC 2015

Doktorand: MUDr. Mohamed Ghothim

Doktorský studijní program: Chirurgie

Školící pracoviště: I. chirurgická klinika Lékařské fakulty
Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice
Olomouc

Školitel: MUDr. Martin Loveček, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vykonal samostatně a uvedl jsem veškerou použitou literaturu. Projekt byl realizován na pracovištích I. chirurgické kliniky LF UP a FN v Olomouci pod odborným vedením vedoucího sekce hepatopankreatobiliární chirurgie MUDr. Martina Lovečka, Ph.D. a v úzké spolupráci s kolegy z Laboratoře experimentální medicíny pod odborným vedením vedoucího této laboratoře doc. MUDr. Mariána Hajdúcha, Ph.D.

Poděkování

Tato práce by nemohla být úspěšně dokončena, pokud by nebyla podporována mým školitelem, mými nadřízenými a mou rodinou. Proto chci poděkovat zejména mému školiteli MUDr. Martinu Lovečkovi, Ph.D., Doc. Romanu Havlíkovi, Ph.D. za trvalou podporu, cenné rady a vedení po stezce vědeckého výzkumu. Současně chci poděkovat přednostovi I. chirurgické kliniky prof. MUDr. Čestmíru Neoralovi, CSc. za inspirativní pobyt strávený na jeho pracovišti, bez kterého by vznik této práce nebyl možný. Poděkování patří rovněž kolegům z Laboratoře experimentální medicíny, kteří pracovali na vyhodnocení odebraného materiálu a stanovili hodnoty exprese tumorózních markerů, které jsou součástí této práce, a to především MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D.

Na mateřském pracovišti Kroměřížské nemocnice a.s. patří dík za technickou pomoc a roli mentora prim. MUDr. Lumíru Domesovi.

Práce na tomto projektu je podpořena granty : IGA UP 2014-019, IGA LF 2014-030, CZ.1.07 /2.3.00/ 30.0004, NPU L01304 a TAČR TE02000058.

Své rodině děkuji za vytvoření zázemí porozumění, trpělivosti a tolerance.

Obsah

1. Seznam použitých zkratek
2. Teoretická část práce
 - 2.1. Úvod
 - 2.2. Karcinom pankreatu – přehled současného stavu problematiky
 - 2.2.1. Epidemiologie
 - 2.2.2. Etiologie
 - 2.2.3. Patogeneze
 - 2.2.4. Symptomatologie
 - 2.2.5. Diagnostika
 - 2.2.6. Molekulární genetik
 - 2.2.7. Klasifikace
 - 2.2.8. Současné možnosti léčby, trendy a východiska
 - 2.3. Minimální reziduální choroba
 - 2.3.1. Současné možnosti stanovení minimální reziduální choroby u karcinomu pankreatu
 - 2.3.2. Metody detekce
 - 2.3.3. Markery vhodné k stanovení minimální reziduální choroby u karcinomu pankreatu
 - 2.3.4. Význam stanovení minimální reziduální choroby pro onkologickou praxi.
3. Experimentální část práce
 - 3.1. Cíle práce
 - 3.2. Materiál a metodika
 - 3.2.1. Materiál a jeho odběr
 - 3.2.2. Zpracování materiálu v Laboratoři experimentální medicíny
 - 3.2.3. Specificita a senzitivita použité metody
 - 3.2.4. Statistické zpracování
 - 3.2.5. Soubor pacientů
 - 3.3. Výsledky

3.3.1. Vztah exprese EGFR v peritoneální laváži k prognostickému významu

3.3.2. Vztah exprese CEA v peritoneální laváži k prognostickému významu

3.3.3. Vztah h-TERT v peritoneální laváži k prognostickému významu

4. Souhrnné výsledky a diskuse
5. Závěr
6. Souhrn
7. Summary
8. Seznam použité literatury
9. Přehled publikací a přednášek autora
10. Přílohy

1. Seznam použitých zkratk

5-FU	5-fluorouracil
AJCC	American Joint Committee of Cancer
APC	gen adenomatosis polyposis coli
bcl-2	b-cell lymphoma-2
BMI	body mass index
BRCA1	breast cancer type 1 susceptibility antigen
BRCA2	breast cancer type 2 susceptibility antigen
CA 15-3	glykopeptidový nádorový marker
CA 19-9	glykolipidový nádorový marker
CA-19	cytokeratin 19
CA-20	cytokeratin 20
CDKN2A	cyklin dependentní kináza 2A
cDNA	complementary DNA
CEA	karcinoembryonální antigen
c-erbB-2	gen ptačí erytroblastózy
CI	confidential interval
c-myc	gen ptačí myelocytomatózy
CT	computer tomography
CTCs	circulating tumor cells
DFS	disease free survival
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTC4	gen deleted in pancreatic cancer 4
DTCs	disseminated tumor cells
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGFR	epidermal growth factor receptor
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
ERCP	endoskopická retrográdní cholangiopankreatikografie
ERS	extra risk score
EUS	endoultrasonografie
FAMMM	familial atypical multiple mole melanoma
FAP	familiární adenomatózní polypóza

FNAB	fine needle aspiration biopsy
GAPDH	glycerladehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GDP	guanosin-5'-difosfát
GEM	gemcitabin
GTP	guanosin-5'-trifosfát
HER1 - 4	human epidermal growth factor1 - 4
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
CHT	chemoterapie
JPS	japan pankreas society staging system
K-ras	Kirstenův gen potkaního sarkomu
LBK1	tumor supresorový gen
MDM2	mouse double minute 2 homolog
MDM4	mouse double minute 4 homolog
MLH1	MutL homolog 1
MR	magnetická rezonance
MRD	minimal residual disease
mRNA	mesenger RNA
MSH2	MutS homolog 2
NOR ČR	Národní onkologický registr České republiky
p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p53	protein kódovaný genem TP53
PCR	polymerase chain reaction
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
PDGF	platelet derived growth factor
PET-CT	kombinace pozitronové emisní tomografie a výpočetní tomografie
PJS	Peutz-Jeghers syndrome
pRb	retinoblastoma protein
PRSS1	protease serine1 (trypsin 1)
RNA	ribonukleová kyselina
RT	radioterapie

SPINK1	serine protease inhibitor Kazal-type 1
STK11	tumor supresorový gen
TGF-alfa	transforming growth factor alfa
TGF-beta	transforming growth factor beta
TNM	Tumor, Nodus, Metastasis
UICC	ÍUnion Internationale Contre de la Cancer
UZ	ultrazvuk
VEGF	vascular endothelial growth factor

2. Teoretická část práce

2.3. Úvod

Karcinom pankreatu zůstává po několik posledních dekád nadále významným medicínským problémem a výzkumnou výzvou. Vysoká biologická aktivita a agresivní povaha karcinomu pankreatu již od počátečního stadia určují tomuto onemocnění téměř infaustní prognózou. Narůstající incidence karcinomu pankreatu v České republice i v celosvětovém měřítku, v roce 2012 celosvětově diagnostikováno 338.000 nových případů, není v korelaci s dosaženými výsledky v léčbě, délce přežívání postižených pacientů a ve snížení mortality. Ve srovnání s jinými malignitami je však incidence nízká, je to dvanáctá nejčastější malignita, dostupné diagnostické metody mají nízkou senzitivitu a jsou finančně náročné, a proto neumožňují plošný screening populace. Postihuje převážně populaci ve věku 45 až 80 let s maximem po 75 roku života, s genderovým výskytem asi 1:1.

Onemocnění se zpravidla klinicky manifestuje až v pokročilých stádiích s metastatickým postižením převážně lymfatických uzlin, jater a peritonea, v 95 % případů je histologicky popisován duktální adenokarcinom.

Radikální resekce, zatím jediná potenciálně kurabilní metoda léčby, je možná pouze u 20-30% pacientů. Bezprostřední výsledky standardizovaných operačních postupů včetně regionální lymfadenektomie jsou velmi dobré, dlouhodobě však nesnižují extrémně vysokou letalitu a neprodlužují střední dobu přežití pacientů s karcinomem pankreatu. Asi 95% pacientů umírá během prvního roku a pouze 2-4% pacientů přežívá 5 let.

Příčiny krajně neuspokojivého stavu jsou tak dlouhodobě známy – pozdní diagnostika, obtížné dosažení skutečně radikální resekce (R0) a absence efektivní celkové protinádorové terapie [1]. Podle velkých studií je pětileté přežití u resekovaných 10-25% s mediánem 10-20 měsíců [2].

Karcinom pankreatu je multioborovým problémem zahrnujícím oblast gastroenterologie, břišní chirurgie, onkologie, endokrinologie, radiologie, molekulární genetiky a epidemiologie.

Vlastní chirurgická technika a metodika se patrně blíží svému limitu a v této oblasti nelze očekávat další velké zlepšení. Poznatky z oblasti molekulární genetiky se zdají být slibnou cestou ke zlepšení v terapii adenokarcinomu pankreatu.

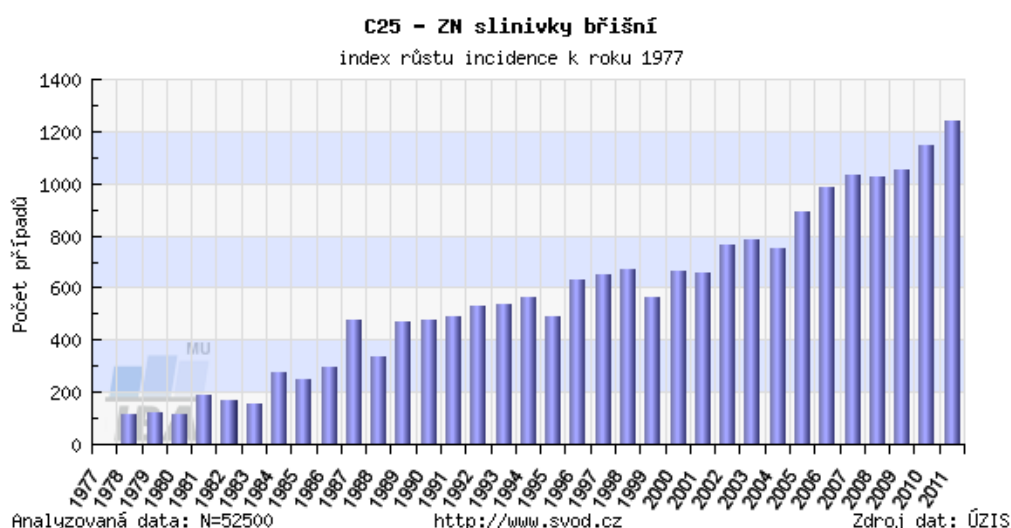
2.2. Karcinom pankreatu – přehled současného stavu problematiky

2.2.1. Epidemiologie

Podle Národního onkologického registru České republiky (NOR ČR) byla v roce 2001 hlášena hrubá incidence karcinomu pankreatu 15,7 na 100 000 za rok u mužů a 15,2 na 100 000 za rok u žen, onemocnělo 784 mužů a 796 žen [3].

O deset let později v roce 2011 udává NOR ČR hrubou incidenci 21,6 na 100 000 za rok u mužů a 20,1 na 100 000 za rok u žen, onemocnělo 1111 mužů a 1073 žen [4].

Z uvedených dat je patrné, že incidence karcinomu pankreatu má v České republice trvale stoupající trend a jen za poslední dekádu stoupl absolutní počet případů o 38,2%.



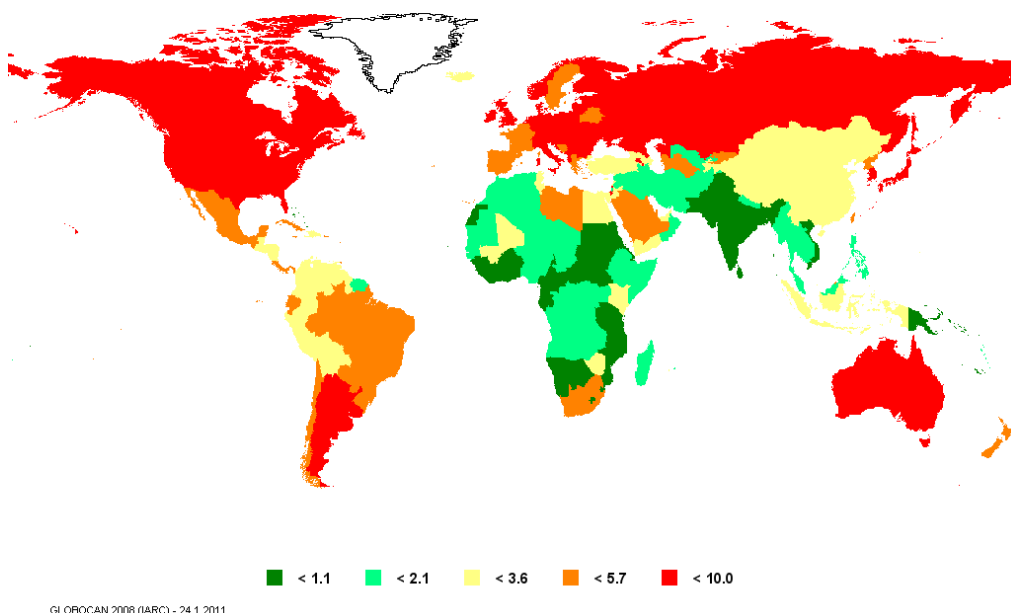
Graf 1. Index růstu incidence 1977 – 2011 v České republice [5]

Z genderového pohledu je patrný druhý trend – vyrovnávání počtu nemocných mužů a žen. Pro komparaci epidemiologických dat mezi různými populacemi je třeba hrubou incidenci nahradit incidencí standardizovanou. Světová standardizovaná incidence karcinomu pankreatu v České republice v roce 2001 činila 10,6/100 000 u mužů a 7,3/100 000 u žen. Za stejné období stoupla tato standardizovaná incidence v roce 2011 na 12,2/100 000 u mužů a 8,2/100 000 u žen [3,4].

Poslední data z Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny z roku 2013 uvádějí Českou republiku s nejvyšší mírou standardizované incidence rakoviny pankreatu v roce 2012 tj. 9,7/100 000, následovanou Slovenskem a Arménií. U mužů dosahuje pro rok 2012 tato standardizovaná incidence hodnoty 11,9/100 000, u žen 7,9/100 000 [6].

Podle stejného zdroje asi 55 procent případů rakoviny slinivky bylo diagnostikováno v rozvinutých zemích, v 53 procentech případů byla diagnóza zjištěna u mužů a v 58 procentech případů byla diagnóza potvrzena u žen. Nejvyšší výskyt rakoviny slinivky břišní, a to u mužů i u žen, byl v Evropě a v Severní Americe; nejnižší výskyt v Africe a Asii.

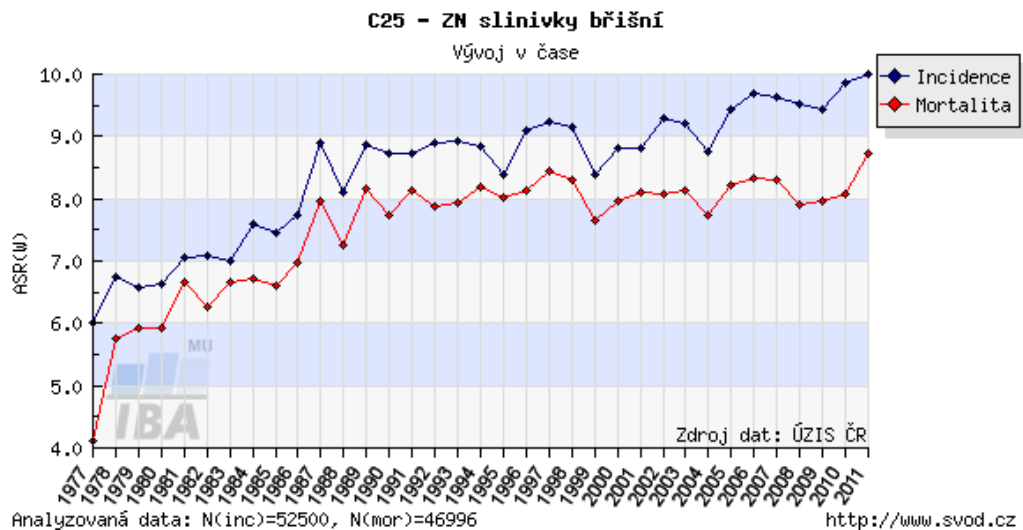
Při globálním geografickém posuzování incidence karcinomu pankreatu je však nutno vzít v úvahu skutečnost, že nejnižší incidence jsou referovány z oblastí s nízkou úrovní zdravotní péče, nízkým průměrným věkem populace a celkově výrazně slabou ekonomickou úrovní společnosti.



Graf 2. Věkově standardizovaná incidence na 100 000 osob ve světové populaci

Incidence stoupá ve věkových kategoriích nad 50 let. Je odhadováno, že v posledních 5 letech je světová standardizovaná prevalence postižených rakovinou slinivky břišní 4,1 za rok na 100.000 osob [6].

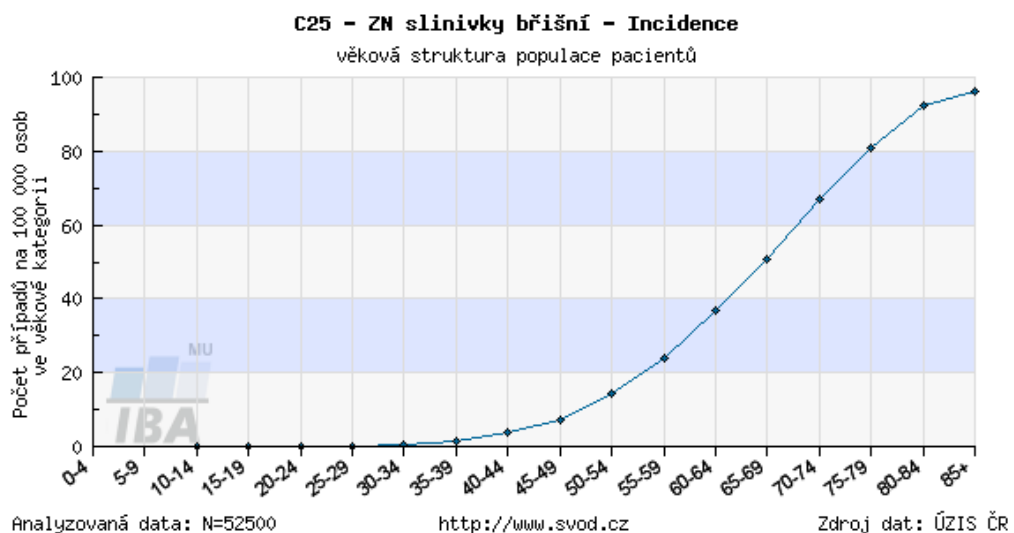
Tento typ zhoubného onemocnění (ZN) je téměř vždy fatální, a je sedmou nejčastější příčinou úmrtí na ZN v globálním světovém srovnání [6] a čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na ZN v rámci České republiky [4], v mortalitě mezi zhoubnými nádory gastrointestinálního traktu je na druhém místě [4]. Mortalita se velmi blíží incidenci. Z údajů NOR ČR je zřejmé, že v roce 2001 zemřelo na karcinom pankreatu 799 mužů a 816 žen respektive 16,0/100 000 mužů a 15,6/100 000 žen [3]. Statistická data NOR ČR za rok 2011 uvádějí 1037 úmrtí u mužů a 996 úmrtí u žen, respektive 20,1/100 000 mužů a 18,6/100 000 žen [4].



Graf 3. Vývoj incidence a mortality karcinomu pankreatu v České republice 1977-2011 [5]

2.2.2. Etiologie

Primárním rizikovým faktorem je věk, neboť manifestace karcinomu pankreatu v prvních třech dekádách života je raritní a vždy spíše svědčí pro primární genetickou příčinu. Incidence prudce stoupá s věkem s maximem v osmém decéniu, téměř 80% diagnostikovaných karcinomů pankreatu je ve věkové skupině 60 a více let.



Graf 4. Věková struktura pacientů s karcinomem pankreatu v České republice

Dlouhodobě je diskutován a zkoumán vliv tabakismu, obezity a dietních návyků, profesionální expozice těžkých kovů (kadmium, chrom) a organických sloučenin (rozpouštědla, ropné produkty), radiace, abúzu alkoholu či kyseliny acetylsalicylové, asociace s chronickou pankreatitidou a cholelitiázou, s provedenou gastrektomií a s diabetem.

Tabakismus

Možný mechanismus působení N-nitrosaminů obsažených v tabákovém kouři je vysvětlován sekrecí jejich metabolitů do žluče a následným refluxem do pankreatického vývodu. Někteří autoři udávají až 3 násobné riziko vzniku karcinomu pankreatu u kuřáků cigaret, ale toto vyšší relativní riziko u kuřáků nebylo přesvědčivě prokázáno.

Diabetes mellitus

Relativní riziko představuje víceleté trvání diabetes mellitus druhého typu se sníženou glukózovou tolerancí v korelaci s dietním návykem zvýšené konzumace živočišných produktů.

Chronická pankreatitida a cholelitiáza

Vztah mezi chronickou pankreatitidou a zvýšenou dispozicí pro rozvoj karcinomu pankreatu je opakovaně diskutován. V centru hypotézy „pěstitelské terorie“ je předpoklad, že chronická pankreatitida vyvolává genetické defekty v buňkách pankreatu a současně probíhající reparační proces přes růstové faktory a cytokiny (EGF, PDGF, TGF-alfa, TGF-beta) kultivuje tyto defekty do neoplastického procesu [7]. Lowenfels udává riziko vzniku karcinomu pankreatu 16x vyšší u pacientů s chronickou pankreatitidou [8]. Vliv cholelitiázy a v anamnéze prodělané cholecystektomie či gastrektomie na vznik rakoviny slinivky břišní nebyl prokázán [9].

Alkohol

Vyšší relativní riziko u konzumentů etanolu však nebylo přesvědčivě prokázáno. Přímá souvislost sekvence etylismu – chronická pankreatitida – karcinom pankreatu není všeobecně akceptována.

Obezita

Nadváha nebo obezita během rané dospělosti zvyšuje riziko vzniku rakoviny slinivky břišní a je také spojena s mladším věkem při diagnóze. Nadváha nebo obezita jsou později v životě spojeny s horším přežíváním rakoviny pankreatu [6].

Další diskutovaná rizika

Organické sloučeniny – hypotéza o vyšší incidenci karcinomu pankreatu a expozicí ropných produktů, rozpouštědel, těžkých kovů a radiace nebyla prokázána.

2.2.3. Patogeneze

Karcinom pankreatu je dnes mnohými autory prakticky považován za téměř genetické onemocnění. Jeho vznik a progresse jsou provázeny sekvenční akumulací genetických změn, z nichž nejvíce pozornosti je zaměřeno na onkogen K-ras a tumor supresorové geny p16, p53 a DPC4. Jejich přítomnost byla prokázána již v preneoplastických lézích pankreatu (PanIN lézích), proto představují potenciální markery malignity pro účely diferenciální diagnostiky a případného screeningu [10].

Dědičné rizikové faktory

- Hereditární pankreatitida
- Familiární karcinom pankreatu
- Cystická fibróza

Hereditární pankreatitida

Hereditární pankreatitida je autozomálně dominantně dědičné onemocnění, známé od roku 1952 (popsáno Comfortem a Steinbergem), u kterého byly identifikovány mutace genů PRSS1 a SPINK1. U této vzácné formy chronické pankreatitidy, která je autozomálně dominantně dědičná s 80% penetrancí, byla popsána mutace genu kódujícího kationický trypsinogen na chromosomu 7q35. Takto postižení jedinci trpí od dětství opakovanými atakami pankreatitidy, které vyústí v chronickou formu onemocnění a nezhledka onemocní karcinomem pankreatu s udávaným 40% rizikem jeho vzniku, vyššímu riziku jsou vystaveni i členové rodiny bez manifestace chronické pankreatitidy (7x až 9x) [11].

Familiární karcinom pankreatu

Familiární karcinom pankreatu byl popsán v roce 1989 (Lynch a spol.) a je definován jako duktální karcinom pankreatu, který je manifestován u dvou prvostupňových příbuzných. Familiární karcinom pankreatu je autozomálně dominantně dědičné onemocnění s dosud nejasnou mutagenní příčinou, obecné riziko vzniku karcinomu při dožití 80 let 9-38 %. Odhadované riziko vzniku karcinomu pankreatu u osob pocházející z rodiny s dvěma postiženými členy je 6,4x vyšší, u osob s třemi postiženými členy rodiny je 32 násobné [12].

Cystická fibróza

Cystická fibróza je jedním z nejčastějších kongenitálních onemocnění pankreatu a osoby postižené touto chorobou mají 6,5 násobné riziko vzniku karcinomu pankreatu. Cystická fibróza patří v České republice mezi nejčastější autozomálně recesivně dědičná onemocnění. Incidence se odhaduje na 1/2700 – 1/3800 novorozenců a frekvence zdravých přenašečů pak na 1/26 – 1/33. Onemocnění je způsobené mutací genu produkujícího protein CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator).

Další dědičné syndromy asociované s karcinomem pankreatu

- Peutz-Jeghersův syndrom (PJS)

- Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom – Lynchův syndrom
- Familiární atypický mnohočetný kožní melanom (FAMMM)
- Syndrom melanom-karcinom pankreatu
- Hereditární karcinom prsu a ovaria
- Familiární adenomatózní polypóza (FAP)

Peutz-Jeghersův syndrom (PJS)

Jedná se o autozomálně dominantně dědičné onemocnění charakterizované kombinací melaninových pigmentací a polypózou v průběhu celého intestinálního traktu. Malignizace samotných polypů je relativně vzácná, nemocní však mají výrazně zvýšené riziko jiných neoplazií, samotné riziko vzniku karcinomu pankreatu je 136 násobné, celoživotní riziko je asi 36%. Příčinou je mutace genu STK11/LBK1, který působí v regulaci buněčné proliferace [13].

Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom – Lynchův syndrom (HNPCC)

Autozomálně dominantně dědičný stav sdružený se vznikem karcinomů převážně pravé poloviny tlustého střeva, souběžný vznik karcinomu pankreatu je přibližně 6x vyšší než u běžné populace. Lynchův syndrom je způsoben mutací genu MLH1 a MSH2.

Familiární atypický mnohočetný kožní melanom (FAMMM)

FAMMM (familial atypical multiple mole melanoma) je vzácný autozomálně dědičný syndrom projevující se mnohočetnými kožními dysplastickými névy a melanomy. Stejně jako u syndromu melanom-karcinom pankreatu u postižených jedinců se objevuje mutace genu pro cyklin-dependentní kinázu 2A (CDKN2A), která je zodpovědná za vznik karcinomu pankreatu. Riziko ve srovnání s běžnou populací je 13-ti násobné [14].

Hereditární karcinom prsu a ovaria

Podobně nosiči mutace BRCA1 mají relativní 3,1x zvýšené riziko vzniku karcinomu pankreatu a mutace BRCA2 dokonce až 6,6x zvýšené stejné riziko.

Familiární adenomatózní polypóza (FAP)

Molekulární podstatou tohoto autozomálně dominantně dědičného onemocnění tlustého střeva převážně mladých jedinců je vrozená mutace tumor supresorového genu APC na 5. chromozomu. APC je klasický tumor supresorový gen, hraje centrální roli v signalizační kaskádě Wnt/Wingless. Tato signální dráha reguluje aktivitu proteinu β -catenin. Vlivem APC dochází k degradaci β -catenin v proteazomech a tím k přerušení signalizace. β -catenin je transkripční faktor, který ovlivňuje expresi celé řady genů, v tomto případě zejména c-myc. Ztráta funkce APC vede k vyšší transkripci genů zodpovědných za proliferaci [15].

Extrémní variace ve výskytu rakoviny v různých tkáních je dávno a dobře známa – například celoživotní riziko vzniku zhoubného nádoru plic je 6,9%, štítné žlázy 1,08%, mozku 0,6% nebo chrupavek hrtanu 0,00072%. Některé typy tkání mohou tudíž vést k manifestaci lidské rakoviny milionkrát častěji než ostatní. Jen asi 30% zhoubných nádorů vzniká na podkladě vlivu vnějšího prostředí či dědičných predispozicí. Nicméně pouze 5-10% všech případů rakoviny mají dědičnou složku, a dokonce i když mohou být identifikovány dědičné faktory u predisponovaných jedinců, způsob jakým se tyto faktory uplatňují v rozdílech ve výskytu rakoviny mezi různými orgány je nejasný. Riziko vzniku rakoviny je spíše spojeno s náhodným vznikem mutací při replikaci DNA ve zdravých kmenových buňkách. Stochastický vliv na mutaci při replikaci DNA lze numericky odhadnout a odlišit od vnějších faktorů životního prostředí a jeho vliv je důležitější než dědičné nebo vnější faktory životního prostředí.

Většina buněk v tkáních jsou částečně nebo úplně diferencované buňky, pro které je typická krátká živostnost, a je proto nepravděpodobné, aby byly původcem možného vzniku nádoru. Pouze ty kmenové buňky, které se mohou

samy obnovovat a jsou zodpovědné za vývoj a údržbu architektury dané tkáně a často tvoří malou část z celkového počtu buněk v tkáni, podléhají při vlastní replikaci DNA náhodným mutacím. Korelace mezi počtem dělení kmenových buněk a celoživotním rizikem vzniku karcinomu je vysoce pozitivní a není ovlivněna faktory životního prostředí nebo faktory dědičnosti. (Spearman' s rho = 0,81; p <3,5 x 10-8), Pearson 's lineární korelace 0,804, (p <5,15 x 10-8).[16] To znamená, že stochastické následky mutací replikace DNA se jeví jako zásadní při vzniku lidské rakoviny.

Při klasifikaci 31 nádorů různých orgánů na podkladě ERS (extra risk score) byly malignity zařazeny do dvou skupin. První skupina D-nádorů (deterministický typ) vykazala u 9 malignit relativně vysoké ERS, druhá skupina R-nádorů (replikativní typ) je tvořena 22 malignitami s relativně nízkým ERS, u kterých jsou replikativní vlivy zásadní. Při srovnání obou skupin zaujal karcinom pankreatu ve skupině R-nádorů prvenství s hodnotou ERS - 17,83 což ukazuje na fakt, že příčiny jeho vzniku jsou především v důsledku náhodných mutací kmenových buněk při replikaci DNA [16].

2.2.4. Symptomatologie

V ranných fázích onemocnění je karcinom pankreatu bez klinických projevů, nebo jsou jeho symptomy nespecifické a málo výrazné. Pokročilá choroba se manifestuje bolestí v epigastriu různé intenzity s možnou iradiací do zad, dyspepsiemi (nechutenství, nausea, vomitus), váhovým úbytkem, narůstající únavou a obstrukčním bezbolestným ikterem. Nádor metastázuje nejčastěji do lymfatických uzlin, jater a peritonea.

2.2.5. Diagnostika

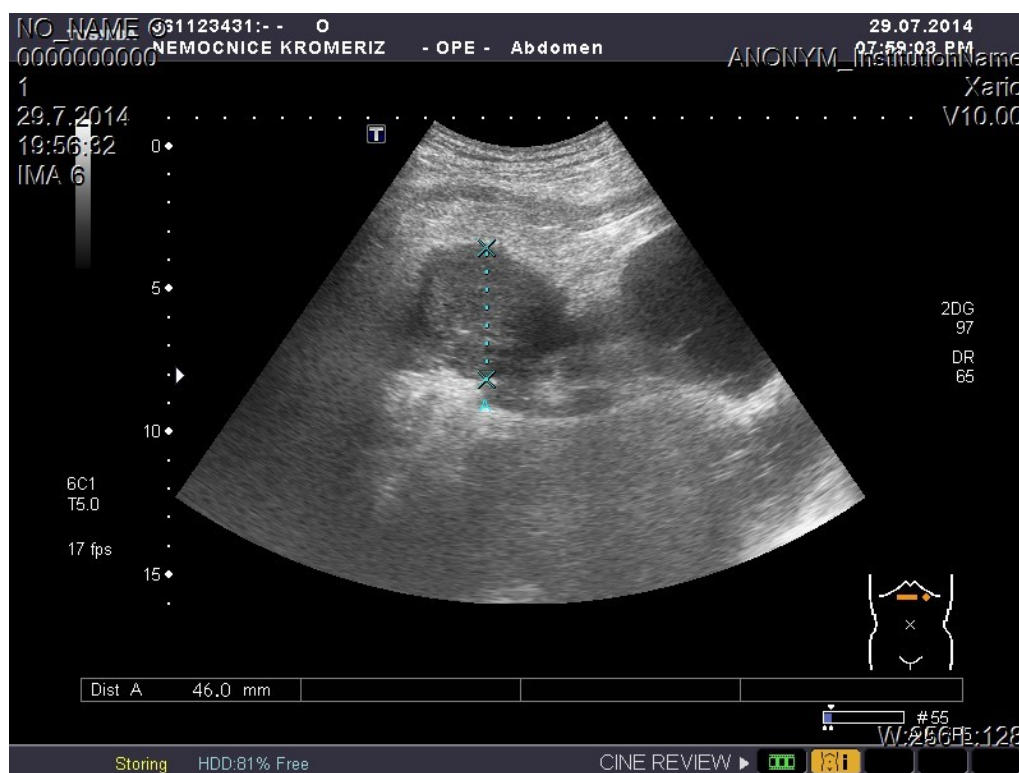
Vzhledem k typickému průběhu choroby s asymptomatickou počáteční fází je časná diagnostika krajně problematická a jen asi 10% adenokarcinomů pankreatu je zachyceno v raných stádiích. Iniciální příznaky závisejí na lokalizaci a velikosti nádoru. Na jedné straně, karcinom těla a ocasu pankreatu může být velmi pokročilý, než se objeví první příznaky, na druhé straně, drobný periampulárně lokalizovaný nádor způsobující bezbolestný obstrukční

ikterus umožňuje časnou diagnostiku karcinomu. S nádorovou obstrukcí souvisí možný rozvoj ascendentní cholangitidy doprovázené teplotami a třesavkou. Bolest je klinickým projevem perineurálního šíření signalizujícím pokročilé stádium nemoci. Iniciálně probíhá v intermitentních atakách, později je kontinuální, má tlakový nebo řezavý charakter. Je lokalizovaná v oblasti nadbříšku s propagací do zad. Pacienti zaujímají úlevovou polohu v sedu či předklonu.

Zobrazovací metody

UZ – ultrasonografie

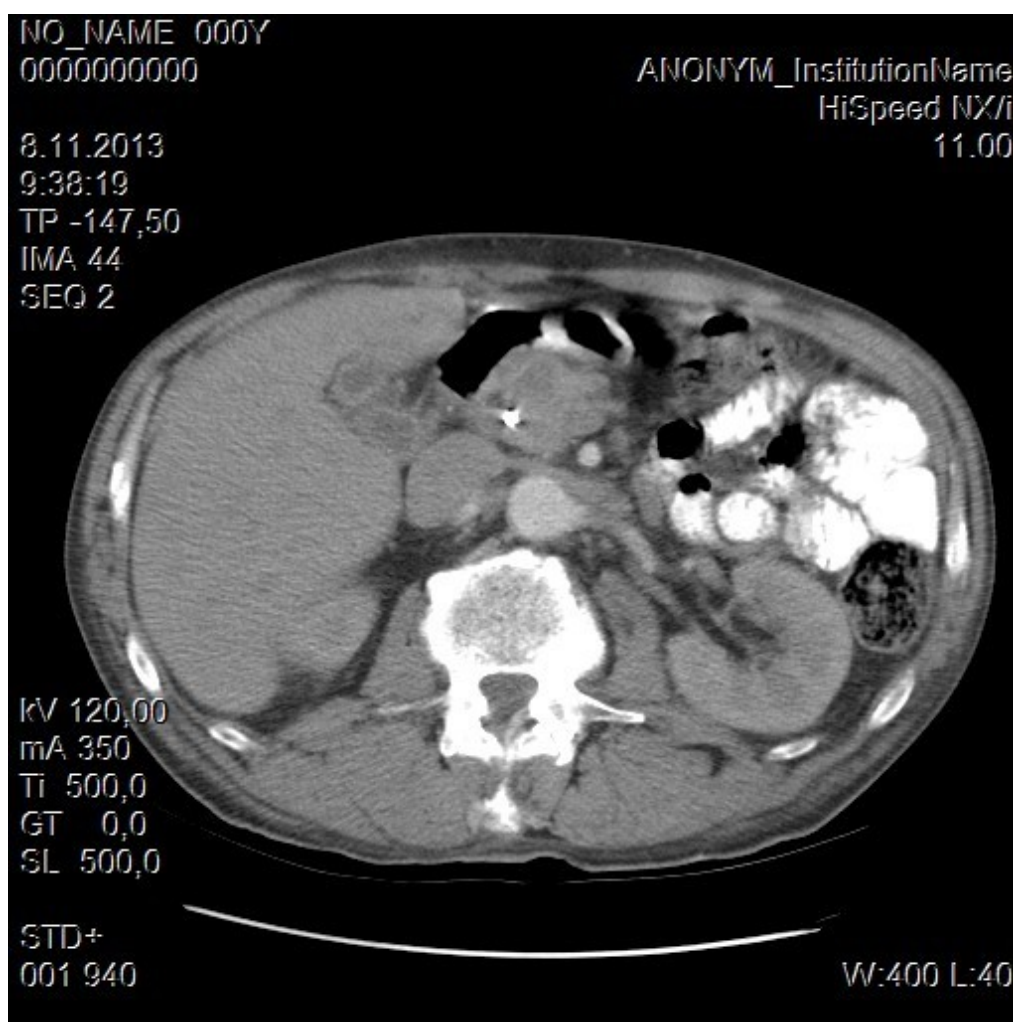
Běžně dostupná, šetrná a lehce opakovatelná abdominální ultrasonografie může až v 80-90% případů u symptomatických pacientů prokázat patologický proces v pankreatu, zejména v oblasti hlavy pankreatu, je-li léze větší než 1cm [17]. Je však limitována konstitucí pacienta (obezita), plynatostí a subjektivní zkušeností sonografisty. Nádory lokalizované v těle a ocasu slinivky se zobrazují obtížně a v terénu chronické pankreatitidy je téměř nemožné je spolehlivě detekovat.



Obr. 1. Sonografický obraz adenokarcinomu hlavy pankreatu

CT – výpočetní tomografie

Dostupnost technicky vyspělých spirálních CT s možností detailního zobrazení nejen samotného tumoru, ale současně i okolních struktur a orgánů, cévního řečiště ve všech fázích plnění, lymfatických uzlin a metastatického postižení činí z této vyšetřovací modalitty zlatý standard diagnostiky karcinomu pankreatu. Zachycení fáze po podání kontrastní látky je nezbytné, neboť nádory pankreatu jsou hypovaskulární a ve srovnání se zdravou tkání se jeví jako hypodenzní. Primárním omezením je zobrazení malých tumorů, menších než 1,5 cm a jejich rozlišení od zánětlivého pseudotumoru při chronické pankreatitidě.



Obr. 2. CT nález tumoru hlavy pankreatu s mnohočetnými MTS v játrech a LU

MR – magnetická rezonance

Slibnou alternativou by mohla být modalita neinvazivní magnetické rezonance nevyžadující podání kontrastních látek. Nádory jsou na T1 vážených obrazech hypointenzní, na T2 převážně hyperintenzní, nespornou výhodou je detailní angiografická informace, zejména při žilní angioinvasi [18]. T1 vážené skeny umožňují dobrou vizualizaci infiltrace retroperitoneálního tuku nádorem, neboť metoda MR může tukovou tkáň potlačit [19]. Nevýhodou této modality je menší prostorové rozlišení, zatím vysoká cena vyšetření, dosažitelnost a stávající kapacita přístrojového vybavení.

PET – pozitronová emisní tomografie

Vyšetření je založeno na snímání distribuce metabolicky aktivní látky značené radionuklidem. V případě pankreatu je používán derivát glukózy označený radioizotopem fluoru (fluorodeoxyglukóza(18F)FDG-PET), který se zvýšeně vychytává v tkáních s vysokou metabolickou aktivitou (tkáň tumoru). Metoda vykazuje senzitivitu 88-92% a specifitu 83-85%, postrádá však informaci o anatomických a topografických detailech [20]. Senzitivita metody je snížena poruchou glukózového metabolismu u diabetiků.

PET/CT – pozitronová emisní tomografie / výpočetní tomografie

Metoda fúze těchto vyšetřovacích metod eliminuje nedostatek PET a zasazuje oblast vysoké metabolické aktivity do anatomicko-topografického kontextu. Modalita je však zatím značně nákladná, a proto je indikace vyhrazena pro případy zásadních diagnostických rozpaků a dilemat mezi zhoubným onemocněním a zánětlivým pseudotumorem slinivky břišní.



Obr. 3. PET/CT nález tumoru pankreatu

EUS – endoultrasonografie

Má místo v diagnostické rozvaze u nejasných CT nálezů a při stanovení předoperačního stagingu karcinomu pankreatu. Léze větší než 2 cm jsou detekovány se senzitivitou 90% a specifitou 100 % [21]. U menších lézi má EUS dokonce vyšší senzitivitu než CT - senzitivita 53% [22] a MR – senzitivita 84%, specifita 97% [23]. Prostřednictvím EUS lze stanovit operabilitu tumoru a případně získat cytologickou verifikaci, je to nejpřesnější metoda pro posouzení venózní angioinvaze, to je infiltrace v. portae, konfluens a v. mesenterica superior. Přesnost EUS ve stanovení operability je 80-85% [24]. EUS je přesnější než CT při průkazu ložiska v hlavě pankreatu, EUS jej odhalilo u 96% pacientů oproti CT 68%. Také při hodnocení stagingu je CT přesné jen u 18,2% nemocných, EUS u 42% nemocných a současně obě metody, zejména

však CT, podhodnocují skutečný finální T staging onemocnění [25]. EUS v kombinaci s odběrem tkáně na cytologii (FNAB-fine needle aspiration biopsy) dosahuje až 100% při odběru materiálu z uzlin N1 [26]. Cytologické vyšetření získaného aspirátu má vysokou pozitivní predikční hodnotu, a proto EUS/FNAB lze využít ve screeningu karcinomu pankreatu u vysokorizikových skupin populace [21].

ERCP – endoskopická retrográdní cholangiopankreatikografie

Je prováděna především u pacientů s příznaky obstrukčního ikteru, resp cholangitid. Typickým příznakem v těchto případech je „double duct sign“, jehož senzitivita je udávána na 85%. Řada autorů se domnívá, že výhodou je současná možnost terapeutické intervence založením biliárního stentu k zajištění drenáže, poslední studie však hodnotí tento postup kriticky. S předoperační dekompresí žlučových cest je však spojen signifikantně vyšší výskyt infekčních pooperačních komplikací [27].

2.2.6. Molekulární genetika

Geny nejčastěji spojené s vývojem karcinomu pankreatu můžeme rozdělit do 3 skupin:

1. Onkogeny (K-RAS, c-myc, c-erB-2, bcl-2)
2. Nádorové supresory (p16, p53, Rb, BRCA1, BRCA2, DPC4)
3. Geny opravující genom (MLH1, MSH2)

K-ras

K-ras je humánní homolog virového onkogenu Kirstenova krysího sarkomu kódující GTP (guanosin-5'- trifosfát) vázající protein, který se sám inaktivuje pomocí cyklické přeměny makroergní vazby GDP na GTP jako odpověď na stimulaci povrchových receptorů, včetně EGFR. Rodina onkoproteinů Ras je lokalizována na vnitřní straně cytoplazmatické membrány. Mutovaný Ras nedokáže hydrolyzovat GDP na GTP, je tedy

permanentně aktivní a trvale přenáší signál do buňky, který je dále šířen několika signálními drahami spouštějícími další kaskády.

Jedná se o bodové mutace změny smyslu (aminokyseliny), velice přesné a cílené mutace zasahující kodóny 12 (98% ze všech K-ras mutací), 13 a 61. K-ras onkogen kóduje protein, který hraje významnou roli v signální cestě spouštěné EGFR (epidermal growth factor receptor), významné pro vývoj a progresi nádorových onemocnění.

Regulační onkogen K-ras se v nádorech objevuje ve dvou různých typech, jednou jako „normální“ nemutovaný K-ras protein, známý jako onkogen divokého typu – wild type K-ras, nebo abnormální – mutovaný K-ras. V nádorech s mutovanou verzí K-ras je tento permanentně „zapnut“ bez aktivace cestou EGFR, kdežto v nádorech s divokým typem K-ras je tento protein pouze přechodně aktivován přes EGFR. Stav receptoru K-ras (mutovaný X nemutovaný–divoký) je indikátorem prognózy a prediktorem odpovědi na některé léky. Mutačně aktivovaný K-ras je přítomen ve více než 90% duktálního karcinomu pankreatu a představuje nejčastější genetickou změnu. Se stejně vysokým výskytem (90%) lze K-ras prokázat v prekancerózních low-grade Panin 1A lézích [10,28] Kromě toho se ukázalo, že trvale onkogenní signalizace K-ras je také nezbytná pro růst a udržování metastatických lézí [29]. To je v souladu se studii s lidskými buněčnými liniemi tumorů pankreatu, které jsou závislé na přežití a trvalé proliferaci na onkogenním K-rasu [30].

Sekvenováním genomu bylo zjištěno, že lidský duktální adenokarcinom pankreatu je velmi heterogenní onemocnění s různými molekulárními podtypy [31]. Tak zvaný „klasický podtyp“ (42,2%) má vysokou expresi epiteliálních genů a je silně závislý na K-ras signalizaci. Další podtypy - „kvazi mezenchymální“ a „exokrinně podobný“ se vyskytují v 36,5% a 22,3% [32].

c-myc

Nadměrná exprese Myc-onkoproteinů je u řady nádorů zásadním krokem v jeho genezi, působí zejména v buněčném jádře, a to jako sekvenčně specifické DNA-vazebné proteiny. Onkogenní transkripční faktory Myc

vystupují nejen jako transkripční aktivátory, ale jsou schopny i transkripční represe cílových genů. Výsledkem je komplexní a razantní aktivace buněčného růstu a proliferace na několika úrovních – aktivace genů pro cykliny D, CDK4, transkripčních faktorů E2F, genů regulovaných RNA polymerázou, reprimace genů pro inhibitory buněčného cyklu p15, p21, p27, genu pro inhibitor angiogeneze trombospondin-1, HLA genů i genu pro katalytickou telomerázu hTERT. Kromě přímého proliferačního vlivu je stimulována buněčná immortalizace, nádorová neovaskularizace a suprese protinádorové imunitní odpovědi. Mechanismus účinku je tedy odlišný od rodiny onkoproteinů Ras. Paradoxem aktivace Myc onkoproteinů je současná razantní indukce apoptózy.

Bcl-2

Bcl-2 je inhibitor apoptózy působící na regulaci propustnosti vnější mitochondriální membrány, jejímiž póry se pak uvolňují do cytoplazmy mitochondriální iniciátory apoptózy, například cytochrom C. Cytochrom C následně aktivizuje cytoplazmatický komplex Apaf, čímž je spuštěna kaskáda směřující k sebeustrukci buňky. Nadměrně exprimovaný Bcl-2 podstatně redukuje úroveň apoptózy a působí tudíž synergicky s předcházejícími onkogeny.

p16

Důležitá je úloha proteinu p16, který má funkci nádorového supresoru, p16 je inhibitor cyklin dependentní kinázy a inhibicí pRb fosforylace reguluje transkripční program buněčné proliferace. Ztráta funkce proteinu p16 je připisována kouření.

p16 (p16INK4a) je popisován jako antionkogen, který je inaktivován mutacemi, delecí nebo hypermetylací u celé řady malignit (např. melanom, karcinom močového měchýře a další). Jeho produkt účinkuje jako inhibitor cyklin dependentních kináz, zejména cyklin dependentní kinázy 4 (CDK4). p16 odbourává komplexy cyklin D/CDK4 které inaktivují pRb fosforylací. Naopak aktivní forma pRb inhibuje transkripci p16. Funkcí systému pRb/p16 je tedy

regulace buněčného cyklu na přechodu z G1 do S fáze se zpětnou vazbou. pRb působí jako negativní regulátor exprese p16 na úrovni transkripce.

p53

p53 je nádorový supresorový protein kontrolující odpověď buňky na buněčný stres libovolné etiologie. P53 je oligomerní fosfoprotein, latentní transkripční faktor s krátkým poločasem rozpadu. V důsledku jeho aktivace po buněčném stresu je zastaven buněčný cyklus a buňka je buď „renovována“ či dochází k iniciaci apoptózy a následné smrti buňky. Zástava buněčného cyklu může být buď permanentní, tzv. senescence, nebo dočasná. Nádorové buňky bez mutovaného p53 genu reagují na stresovou aktivaci spíše senescencí nebo apoptózou, naproti tomu u normálních buněk dochází k dočasné zástavě buněčného cyklu v G1 nebo G2 fázi. Mutační vyřazení p53 vede k vyřazení adekvátní reakce a maligní buňka trvale proliferuje. Normálně funkční p53 je tedy zásadním faktorem zabraňujícím nádorové transformaci. Neregulovaná aktivita p53 za fyziologických podmínek by byla kontraproduktivní a nebezpečná, neboť by vylučovala dělení buněk a tedy i jejich obnovu a zajištění homeostázy organismu. Činnost p53 je kontrolována specifickými inhibitory MDM2 a MDM4. MDM2 je ubikvitin ligáza, která indukuje jeho proteolytickou degradaci, MDM4 ruší jeho schopnost transkripční aktivace cílových genů.

BRCA1, BRCA2

Gen BRCA1 byl detekován na chromosomu 17q12-21 a pro BRCA2 na chromosomu 13q12-13. Gen je aktivní především v kancerogenezi karcinomu prsu, ale BRCA2 se uplatňuje u malé skupiny pacientů s karcinomem pankreatu.

DPC4

DPC4 (Deleted in Pancreatic Carcinoma) je lokalizován na chromozómu 18q21-1 a jeho specifická funkce není zcela jasná. Pravděpodobně se účastní kódování signálních transduktorů přenášejících signály od rodiny proteinů

TGF-beta k receptorům na buněčných površích. Inaktivace DCP4 byly zjištěny u 50% pankreatických karcinomů. Z toho ve 30 % případů je inaktivace způsobena homozygotní delecí a ve 20 % případů mutací jedné alely a ztrátou druhé [33].

MLH1, MSH2

Absence či mutace genů zodpovědných za opravu replikačních chyb v DNA způsobují, že vzniklé mutace nebudou opraveny, genetické změny se budou rychle v buňkách hromadit a chybný přepis bude implementován do dceřiných buněk častěji a manifestace nádorů bude probíhat v mladém věku.

2.2.7. Klasifikace

Nezbytná klasifikace pro staging tumorózních lézí vychází z doporučení UICC/AJCC, verze z roku 2009, 7. edice [34] nebo z doporučení JPS, verze z roku 2009, 6. edice, které představuje sice složitější, ale přesnější systém [35].

UICC/AJCC staging – 7. edice z roku 2009

Anatomické sublokalizace

1. C25.0 Hlava pankreatu (Nádory hlavy pankreatu jsou ty, které vycházejí napravo od levého okraje vena mesenterica superior. Processus uncinatus se považuje za část hlavy pankreatu.)
2. C25.1 Tělo pankreatu (Nádory těla pankreatu jsou ty, které vycházejí mezi levým okrajem vena mesenterica superior a levým okrajem aorty)
3. C25.2 Kauda pankreatu (Nádory kaudy pankreatu jsou ty, které vycházejí mezi levým okrajem aorty a hilem sleziny)
4. C25.3 Pankreatický vývod
5. C25.4 Langerhansovy ostrůvky (endokrinní pankreas)

TNM klasifikace

T – Primární nádor	
TX	Primární nádor nelze hodnotit
T0	Bez známek primárního nádoru
Tis	Karcinom in situ (zahrnuje též pankreatickou PIN stp.III)
T1	Nádor omezen na pankreas, do 2 cm v největším rozměru
T2	Nádor omezen na pankreas, větší než 2 cm v největším rozměru
T3	Nádor se šíří mimo pankreas, nepostihuje však truncus coeliacus nebo arteria mesenterica superior
T4	Nádor postihuje truncus coeliacus nebo arteria mesenterica superior

Regionální mízní uzliny

Regionální mízní uzliny peripankreatické, které mohou být rozděleny následovně:

Horní	Nad hlavou a tělem pankreatu
Dolní	Pod hlavou a tělem pankreatu
Přední	Přední pankreatikoduodenální, pylorické (pouze pro nádory hlavy pankreatu) a horní mezenterické
Zadní	Zadní pankreatikoduodenální, kolem choledochu a horní mezenterické
Lienální	V hilu sleziny a kolem kaudy pankreatu (pouze pro nádory těla a kaudy pankreatu)
Coeliacké	(pouze pro nádory hlavy pankreatu)

N – Regionální mízní uzliny	
NX	Regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0	Regionální mízní uzliny bez metastáz
N1	Metastázy v regionálních mízních uzlinách N1A: postižení jedné regionální uzliny N1B: postižení více regionálních uzlin

M – Vzdálené metastázy	
MX	Vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	Bez vzdálených metastáz
M1	Vzdálené metastázy

Stadia karcinomu pankreatu			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
IIB	T1-3	N1	M0
Stadium III	T4	Jakékoliv N	M0
Stadium IV	Jakékoliv T	Jakékoliv N	M1

Klasifikace JPN 6. edice z roku 2009

T – primární nádor	
T1	Nádory S0, RP0, A0, DU0, CH0,1: T1a: nádory menší než 2 cm v nejdelším rozměru T1b: nádory větší než 2cm v nejdelším rozměru
T2	Nádory splňující jedno nebo více kritérií: S1, RP1, PV1, A1, DU1,2,3, CH2,3 bez ohledu na velikost
T3	Nádory splňující jedno nebo více kritérií: S2,3, RP2,3, PV3,3, A2,3 bez ohledu na velikost

S	Invaze na serózu
RP	Invaze do retroperitonea
PV	Invaze do portální žíly
DU	Invaze do stěny duodena
A	Invaze do artérií
CH	Invaze do ductus choledochus
P	Diseminace na peritoneum
H	Metastatické postižení jater
Index 0	Invaze nepřítomna
Index 1	Suspektní invaze
Index 2	Jistá invaze
Index 3	Masivní invaze

N – Regionální mízní uzliny	
N0	bez metastáz
N1	Metastázy do skupiny primárních lymfatických uzlin uložených v blízkosti Nádoru
N2	Metastázy do sekundárních lymfatických uzlin mezi N1 a N3
N3	Metastázy do terciálních, juxta-regionálních lymfatických uzlin

1	Pravá kardie
2	Levá kardie
3	Podél malé kurvatury
4	Podél velké kurvatury
5	Suprapyloricky
6	Infrapyloricky
7	Podél a.gastrica l.sin.
8	Podél a.hepatica communis

8a	Anterosuperior
8b	Posterior
9	Podél truncus coeliacus
10	V hilu sleziny
11	Podél a.lienalis
12	V ligamentu hepatoduodenale
12h	V porta hepatis
12a	Podél a.hepatica
12a1	Superior
12a2	Inferior
12p	V pozadí od v.portae
12p1	Superior
12p2	Inferior
12b	Podél ductus hepaticus
12b1	Superior
12b2	Inferior
12c	Podél ductus cysticus
13	Na zadní straně hlavy pankreatu
13a	Nad Vaterskou papilou
13b	Pod Vaterskou papilou
14	V mesenteriu
14A	Podél a.mesenterica superior
14a	Na začátku a.mesenterica superior
14b	Podél a.pancreaticoduodenalis inf.
14c	Na začátku a.colica media
14d	Podél první jejunální kličky
14V	Podél v.mesenterica superior
15	Podél v.coeliaca media
16	Podél aorta abdominalis
16a1	Podél hilus aorticus diaphragmae

16a2	Mezi horní částí coeliackého trunku k dolnímu okraji levé renální žíly
16b1	Od dolního okraje levé renální žíly k hornímu okraji a.mesenterica inf.
16b2	Od dolního okraje a.mesenterica inf. k bifurkaci aorty
17	Na přední straně hlavy pankreatu
17a	Nad Vaterskou papilou
17b	Pod Vaterskou papilou
18	Podél dolního okraje těla a kaudy pankreatu

N0	Bez přítomnosti metastáz
N1	Metastázy do první skupiny lymfatických uzlin: 13ab,17ab
N2	Metastázy do druhé skupiny lymfatických uzlin: 8a, 8p, 12ab, 12p, 14p, 14d
N3	Metastázy do třetí skupiny lymfatických uzlin zahrnující oblast coeliackého trunku, lienální artérie, hilu slezinného a podél a.coeliaca media: 16a2, 16b1, 18)

M – Vzdálené metastázy	
M0	Vzdálené metastázy nepřítomny
M1	Vzdálené metastázy jsou přítomny, včetně postižení peritonea nebojater

Stadia karcinomu pankreatu			
Stadium 1	T1a	N0	M0
Stadium II	T1a	N1	M0
	T1b	N0,1	M0
Stadium III	T1a,b	N2	M0
	T2	N0,1	M0
Stadium IV a	T1a,b	N3	M0
	T2	N2	M0
	T3	N0, 1	M0

Stadium IV b	T2	N3	M0
	T3	N2, 3	M0
	Jakékoliv T	Jakékoliv N	M1

M0, P0, H0					
T	N0	N1	N2	N3	M1 nebo P1, 2, 3 nebo H1, 2, 3
T1a	I	II	III	IV a	IV b
T1b	II	II	III	IV a	IV b
T2	III	III	IV a	IV b	IV b
T3	IV a	IV b	IV b	IV b	IV b

2.2.8. Současné možnosti léčby, trendy a východiska

Radikální chirurgická resekční operace (R0) je v současnosti jedinou potencionálně kurabilní modalitou. I tato modalita je však vhodná jen pro 15-20 % pacientů z celkového počtu postižených karcinomem pankreatu [36,37]. Resekce pankreatu je bezpečná operace s nízkou mortalitou, ale špatnou prognózou a neuspokojivým dlouhodobým přežíváním a je zatížena vysokou morbiditou.

PDE (proximální duodenopankreatektomie)

Nejrozšířenější typ operačního výkonu vychází z původní operace dle Whipple (A.O.Whipple 1881-1963) s resekcí distální části žaludku, modifikovaná podle Traverso-Longmire (1978) zachovávající pylorus s lymfadenektomií. Standardní PDE zahrnuje v první fázi vyjmutí hlavy pankreatu, žlučníku, ductus choledochus a duodena asi 2-3 cm aborálně od pyloru. V průběhu lymfadenektomie je odstraňována pojivová tkáň od jaterního hilu podél ligamentum hepatoduodenale, v. portae, v.mesenterica a arteria mesenterica, dále podél a.hepatica communis až k truncus coeliacus.

Některá pracoviště zahajují tuto operaci kocherizací duodena. Druhá, rekonstrukční fáze, spočívá v našíí pankreatojejuno/gastroanastomózy, hepatikojejunoanastomózy a duodenojejunoanastomózy či gastrojejunoanastomózy.

DPE (distální pankreatektomie)

Je indikována v případě lokalizace tumoru pankreatu v těle či kaudě. Jedná se o technicky jednodušší výkon oproti PDE, při kterém je resekována levostranná část žlázy od linie krčku pankreatu s následnou lymfadenektomií a splenektomií.

TPE (totální pankreatektomie)

Bývá doporučována z důvodu onkologické radikality při centrální lokalizaci tumoru či multifokálním tumoru. Přináší však vyšší výskyt komplikací, vznik diabetu a nutnost úplné substituce i exokrinních funkcí. Elektivní TPE z jiných důvodů není doporučována.

Paliativní operace

Indikace k paliativní léčbě směřuje ke zlepšení kvality života a odstranění nejzávažnějších symptomů pokročilého onemocnění – obstrukčního ikteru, poruchy evakuace žaludku a bolesti.

Chemoterapie a radioterapie

Ve spektru léčby karcinomu pankreatu se uplatňují tyto modalitty v závislosti na stadiu onemocnění.

Stádiu I karcinomu pankreatu jednoznačně dominuje radikální operační výkon. Indikace pro adjuvantní chemoradioterapii je sporná a nejednoznačná, benefit pro pacienta je nízký a významně nezlepšuje celkové přežití.

Také ve stádiu II je zásadní léčebnou metodou radikální resekční výkon. Lze o ní uvažovat v případě potenciálně resekovatelného onemocnění s cílem zvýšit pravděpodobnost dosažení R0 resekce, standardní neoadjuvantní režim však dosud nebyl stanoven.

Adjuvantní radioterapie po radikální operaci, s cílem snížit riziko rekurence onemocnění, podávaná konkomitantně s chemoterapií na bázi 5-fluorouracilu nebo gemcitabinu, je možnou modalitou standardní léčby. Ve stádiu III nádorů pankreatu je jen nepatrná část pacientů, u kterých je tumor technicky resekovatelný. Většinou je však u těchto pacientů prováděn paliativní biliodigestivní bypass cestou endoskopickou, radiologickou případně chirurgickou, s nebo bez gastroenteroanastomózy. U pacientů s výrazným algickým syndromem jsou využívány postupy k tlumení bolesti jako je alkoholizace splachnických nervů 50% alkoholem, blokáda ganglion coeliacum či torakoskopická splachnicektomie.

Paliativní operační výkon je opět doplňován konkomitantní chemoradioterapií s 5-FU nebo systémovou paliativní chemoterapií s gemcitabinem ve stejném režimu. Gemcitabin je analog nukleosidu se strukturou podobnou cytosin arabinosidu a je velmi silný radiosenzibilizátor, v současnosti je standardem léčby pokročilého a metastazujícího onemocnění [38].

Stadium IV nádorů pankreatu je v podstatě inkurabilní. Současná chemoterapie vykazuje u těchto nádorů nízkou terapeutickou odpověď a minimální vliv na délku přežití.

Od roku 2006 je dispozici biologická léčba s erlotinibem (Tarceva) v kombinaci s gemcitabinem pro léčbu nemocných s metastazujícím karcinomem slinivky břišní. Erlotinib inhibuje signální cestu lidského epidermálního růstového faktoru receptor I (EGFR/HER1) a způsobuje tak pokles růstu tumoru, snížení metastatického potenciálu a potencuje protinádorový účinek gemcitabinu [39]. Léčba s kombinací erlotinib + gemcitabin oproti léčbě se samotným gemcitabinem signifikantně prodlužuje medián přežití pacientů s metastatickým onemocněním přibližně o 1 měsíc bez zhoršení kvality života nemocných. Lepších výsledků terapie bylo dosaženo u pacientů, u kterých se objevila kožní vyrážka (rash), tito pacienti měli statisticky významně delší dobu celkového přežití než nemocní bez projevů vyrážky.

Zkoušeny jsou i jiné režimy, například FOLFIRINOX (oxaliplatin, 5-fluorouracil, irinotekan a leukovorin), u kterého bylo dosaženo mediánu přežití 11,1 měsíců, ale režim se vyznačuje enormně vysokou toxicitou a dávky je téměř vždy nutno redukovat [40]. Dalším slibným režimem je kombinace gemcitabinu a nab-paklitaxelu (paklitaxel vázaný na albumin - Abraxane®) [41].

Východiska

Objev genů asociovaných s familiárním karcinomem slinivky břišní významně přispívá k pochopení přirozeného průběhu onemocnění a umožňuje pro jedince s tímto vysokým rizikem individualizovanou léčbu prostřednictvím genetického screeningu a poradenství.

Vývoj geneticky upravených myších modelů karcinomu pankreatu má obrovský potenciál k objasnění dalších mechanismů karcinogeneze a odhalení nových funkcí identifikovaných kandidátních genů pro molekulárně cílenou léčbu [42].

2.3. Minimální reziduální choroba MRD (minimal residual disease)

2.3.1. Současné možnosti stanovení minimální reziduální choroby u karcinomu pankreatu

Minimální reziduální nemoc způsobená šířením nádorových buněk do krevního oběhu a to buď před, nebo v průběhu chirurgického výkonu je obecně přijímaná jako hlavní důvod časných metastáz a lokální recidivy u karcinomu pankreatu [43,44]. Současně však existence nádorových buněk v krevním řečišti nemusí být nutně spojována s nevyhnutelností metastatického onemocnění. Implantace cirkulujících maligních buněk je naštěstí neefektivní proces a tyto buňky jsou organismem rychle likvidovány [45,46]. Aktivace koagulace krve během operace však může vést ke zvýšenému zachycení cirkulujících nádorových buněk, a imunosuprese způsobené chirurgickým

stresem může zvýšit metastatický potenciál cirkulujících nádorových buněk [47].

Časná detekce minimální residuální choroby je proto mnohem komplexnějším opatřením, zahrnujícím selekci pacientů s jasným benefitem operačního výkonu, stanovení prediktivního faktoru a včasného zahájení multimodální terapie. K dnešnímu dni je k dispozici poměrně rozsáhlá, ale současně značně rozporuplná a obtížně srovnatelná literatura. Jednotlivé studie a sdělení se liší sledovanými markery s rozdílnou specifitou, metodami detekce s rozdílnou senzitivitou i zdrojovou lokalitou vzorků.

2.3.2. Zdroje a metody detekce

Zdroje

K nejčastěji vyšetřovaným vzorkům patří lymfatické uzliny [48], kostní dřeň [49,50], portální nebo periferní krev [49,52] a peritoneální laváž [50,51,52,53,54].

Vyšetření lymfatických uzlin

Míra detekce šíření nádorových buněk v lymfatických uzlinách byla u karcinomu pankreatu popsána v rozmezí od 44 % do 68 %. Některé práce považují postižení lymfatických uzlin, bez rozdílu jejich počtu, lokalizace či rozsahu operačního výkonu, za průkaz systémového onemocnění, a tudíž bez prognostického významu [55,56]. Scheuermann a spol. vyšetřovali lymfatické uzliny na přítomnost EpCAM-pozitivních buněk a zjistili, že jejich detekce je nezávislým prognostickým faktorem pro délku období bez relapsu i celkové přežití, přičemž přítomnost EpCAM signalizuje spíše vzdálené metastatické postižení než lokální recidivu [48].

Vyšetření kostní dřeně

Různé studie se zaměřily na detekci šířených pankreatických nádorových buněk v kostní dřeni. I když byla popsána pozitivní míra detekce mezi 24% a 58% pro různé markery, detekce nádorových buněk v kostní dřeni nekoreluje se stádiem nádoru a není tudíž nezávislým prognostickým markerem [50].

Vyšetření portální nebo periferní krve

Detekci nádorových buněk v systémové či portální krvi pro snadnou dostupnost zvolila řada autorů, vzorky krve byly odebírány před operačním výkonem a v jeho průběhu. Soeth a spol. zjišťovali pozitivní nádorové buňky prostřednictvím detekce CK 20 u pacientů s duktálním karcinomem pankreatu v kostní dřeni a venózní krvi. Prevalence izolovaných nádorových buněk v krvi se zvyšovala významně se stádiem karcinomu pankreatu dle UICC a nádorové buňky byly zjistitelné v oběhu v poměrně časném stadiu nemoci. Analýzy přežití pacientů po resekci prokázaly prognostický dopad detekce CK 20 pozitivních buněk v kostní dřeni a nebo v krvi [49].

Klos a spol. referují o pozitivní korelaci mezi expresí EGFR v portální krvi a klinickým stádiem ($p < 0,006$), expresí EGFR v portální krvi a stupněm diferenciacie primárního tumoru ($p < 0,045$). Bylo prokázáno statisticky významně kratší přežívání u pacientů s pozitivitou hTERT v systémové a portální krvi [52].

Laváž dutiny břišní

Může být provedena v průběhu operačního výkonu, ale také před ním a po něm. Zde je jasnou nevýhodou invazivita. K peritoneální laváži je použit fyziologický roztok, odebírá se přibližně 200 ml do připravených sterilních lahví, které obsahují živné médium.

Metody detekce

Klasické histopatologické vyšetření lymfatických uzlin

Nejstarší metodou je rutinní histopatologické vyšetření lymfatických uzlin. Vyšetření je zdouhavé, pracné, nákladné, materiál je nutno zpracovat kompletní. Metoda je spojena s vysokým počtem přehlédnutých pozitivních nálezů a informace je omezena pouze na lokální zdroj navíc zatížena značným podílem subjektivního hodnocení, zejména v přechodných a ne zcela typických případech.

Imunocytochemické metody

Pro detekci izolovaných nádorových buněk jsou široce používány dva odlišné přístupy: imunocytochemické (ICC) a molekulárně biologické metody. Imunocytochemické metody jsou stále standardní metodou pro detekci nádorových buněk, ale v posledních letech dochází k rychlému rozšíření použití molekulárních metod založených na PCR pro detekci izolovaných nádorových buněk v hematologických tekutinách.

Obecná omezení imunocytochemických testů spočívají v poněkud subjektivních kritériích vyšetřujícího, který musí rozlišovat mezi skutečnými nádorovými buňkami, pokud jsou přítomny, a laboratorními artefakty (falešně pozitivní nálezy).

Molekulárně biologické metody

RT-PCR

PCR (polymerase chain reaction) byla vyvinuta v Cetus Corporation v Emeryville v Kalifornii a v roce 1985 byla Kary B. Mullisem uvedena do praxe. Principem metody je enzymatická amplifikace DNA in vitro syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích (denaturace, hybridizace a syntéza chybějícího komplementárního úseku DNA). Pomocí této metody můžeme detekovat RNA přítomnou ve vzorku (např. mRNA). V prvním kroku dojde k přepisu RNA do cDNA (complementary DNA) pomocí RNA-dependentní-DNA-polymerasy (reversní transkriptasy).

RNA je následně z hybridu RNA-DNA odbourána, takže zůstane jen čistá cDNA. cDNA může být následně použita pro sekvenaci nebo dále amplifikována Taq polymerasou v další PCR. Opakováním tohoto procesu se logaritmicky vytváří až miliarda kopií úseku cílové molekuly. Produkty PCR se nazývají amplikony a jsou to úseky DNA definované délkou, jejichž velikost se pohybuje obvykle v desítkách či tisících párů bází (bp). Pro PCR je několik nezbytných komponentů pro průběh reakce: Vzorek DNA, obsahující zkoumaný úsek, syntetické primery, směs všech čtyř deoxynukleotidtrifosfátů, Mg^{2+} ionty, Taq polymerázu a PCR pufr. Reakční objem se obvykle pohybuje mezi 10 a 100 μ l. Ionty Mg^{2+} mají v reakční směsi funkci kofaktorů. Tvoří rozpustný komplex s jednotlivými 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) rozpoznávaný DNA-polymerázou. Jelikož hořčičnaté ionty reagují nejen s dNTP, ale i s templátovou DNA, EDTA a dalšími chelatačními činidly a také s primery, je potřeba ve většině případů stanovit pro každou aplikaci optimální koncentraci Mg^{2+} iontů empiricky.

Real-Time RT-PCR (jednokroková reverzně transkripční-polymerázová řetězová reakce s detekcí produktu v čase), kvantifikuje počáteční množství templátu nejspecifičtěji, nejcitlivěji a nejreprodukovatelněji. Principem této metody je sledování vznikajícího produktu v průběhu celé PCR měřením nárůstu fluorescence. Jak již bylo výše zmíněno, nejčastěji se používají interkalační fluorescenční barviva a fluorescenční sondy. Při použití hydrolyzačních sond se nejčastěji využívají RNA sondy s fluorescenčním zářičem a zhášecím fluorescence. Sonda v průběhu replikace hybridizuje s úsekem uvnitř amplifikované sekvence, následně je díky 5' \rightarrow 3' exonukleasové aktivitě Taq polymerasy odstraněn zhášecí a tím je umožněna fluorescenční detekce produktu. Nejčastěji používanou takovouto sondou je TaqMan. Existuje několik možných přístupů využívajících různé reakční chemie (TaqMan probes, molecular beacons, scorpions). Naměřená data jsou automaticky normalizována, aby mohla být vynesena v rozsahu 0-100% do grafu závislosti fluorescence na počtu cyklů. Velmi důležitým parametrem je i CT („threshold cycle“), cyklus, ve kterém emise fluorescence překročí uživatelem zafixovaný práh.

Pro výzkum jsou velmi důležité tyto přednosti PCR: relativně krátké trvání celého procesu, potřeba malého množství DNA, vysoká citlivost a skutečnost, že DNA může být velmi stará a degradovaná. Mezi nevýhody PCR patří: Vysoká citlivost, stává se, že právě vysoká citlivost PCR způsobí, že kontaminace jedinou "jinou" molekulou nese za následek falešnou pozitivitu, a potřeba poznání sekvencí bází amplifikovaného úseku molekuly DNA a nebo minimálně primerů. Problém PCR analýzy je specifita a reprodukovatelnost různých metod popsaných v literatuře. Specifita je negativně ovlivněna vysokou citlivostí RT-PCR metody.

2.3.3. Markery vhodné k stanovení minimální reziduální choroby u karcinomu pankreatu

Pro detekci okultních nádorových buněk byla zvolena nepřímá metoda detekce založená na expresi nádorově specifických genů metodou real-time PCR. Je to metodika nepřímá, využívající faktu, že buňky mesenchymálního původu většinou neexprimují markery epiteliálních nádorů. Tyto markery musí splňovat několik podmínek. Měly by mít velmi vysokou a výlučnou expresi v daném karcinomu, potažmo v uvolněných CTCs a naopak nulovou nebo minimální expresi v testovaném kompartmentu. A to proto, aby exprese markeru v jednotlivých okultních nádorových buňkách byla zachytitelná i na pozadí miliónu nenádorových buněk. Tedy míru exprese specifického markeru, od které si můžeme být s vysokou pravděpodobností jisti, že nás nepřímo informuje o přítomnosti nádorových buněk ve vzorku. O vybraných markerch víme, že se specificky exprimují právě u nádorů pankreatu a mají minimální expresi v buňkách mesenchymálního původu.

CEA

CEA – onkofetální glykoprotein s molekulární hmotností 180-220 kDa a vysokým obsahem sacharidů asi 55%. Lidská CEA genová rodina sestává z 29 genů umístěných na chromozomu 19, z nichž 18 je aktivně transkribováno. Ve

fetálním séru je prokazatelný již od 8.týdne gravidity a jeho produkce stoupá do maxima kolem 22.týdne těhotenství. V dospělosti je v organismu syntetizován jen v minimálním množství buňkami sliznice střev, žaludku a bronchů. Jedná se o vazebný protein buněčného povrchu s pravděpodobnou rolí v procesu buněčné adheze. Předpokládá se, že funkcí CEA je především působit jako repulsní molekula zabraňující kontaktu mezi buňkami, exprese těchto molekul na povrchu nádorových buněk pak může usnadňovat jejich migraci a motilitu, tj. tvorbu metastáz.

Jako nádorový antigen je CEA ve zvýšené míře exprimován u více než 95% nádorů gastrointestinálního traktu, přičemž jeho výskyt je vázán na lépe diferencované skruktury epitelálních buněk těchto nádorů, v anaplastických nádorech obvykle chybí. CEA byl testován ve studiích zabývajících se detekcí cirkulujících nádorových buněk (CTCs) hepatobiliární oblasti [56]. Při analýze nutno brát v úvahu skutečnost, že zvýšená hladina CEA je rovněž zaznamenána u benigních chorob jako je chronické onemocnění jater, pankreatu, renální insuficience a silných kuřáků, u nichž v 10% případů může dosahovat až patologických hodnot. Eguchi et al prokázali za použití RT-PCR pozitivitu CEA v 21.7% nemocných s karcinomem pankreatu a tito nemocní měli horší – kratší „recurrence free interval“ a kratší celkové přežití [57].

EGFR

EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru – je transmembránový receptor tyrosin kinázy, která hraje hlavní roli v regulaci buněčného dělení a smrti. EGFR patří do rodiny HER receptorů (4 příbuzné proteiny), o nichž je známo, že jsou aktivovány vazbou na různé ligandy (například EGF, TGFA, heparin vázající EGF podobný růstový faktor, amfiregulin, betacellin). EGFR je rovněž lokalizován na povrchu buněk a po aktivaci funkčně aktivních heterodimerů (EGFR-HER2, EGFR-HER3, EGFR-HER4) nebo homodimeru (EGFR-EGFR) je indukována aktivace tyrosin kináza, což vede autofosforylaci receptoru na více tyrosinových zbytků. Tento proces vede ke spuštění intracelulární signální kaskády ovlivňující genovou transkripci, což má za následek proliferaci nádorových buněk, snížení

apoptózy, stimulaci procesu invaze a metastázování a rovněž podporuje tumorem indikovanou angiogenezi. EGFR je transmembránový receptor, který se ve zvýšené míře produkuje u pacientů s některými typy nádorů. Kolorektální karcinom exprimuje EGFR ve zvýšené míře v 72 – 82% a v případech metastatického onemocnění až v 89%. EGFR je využíván jako marker nádorových buněk, neboť jeho abnormálně vysoké hladiny byly detekovány na povrchu mnoha typů rakovinných buněk, mimo jiné i u epitelálních karcinomů GIT, včetně tumoru pankreatu, přičemž exprese EGFR byla vyšší na duktálních buňkách pankreatu ve srovnání s buňkami acinárními [58].

hTERT

Stárnutí buněk je způsobeno postupným zkracováním specifických zakončení chromozomů – telomer – při každém mitotickém dělení. Dosáhne-li telomera určité minimální délky, přestává se buňka dále dělit a umírá. Nádorové buňky nemají tento replikační limit díky ribonukleoproteinu telomeráze. Telomeráza je enzym působící jako reverzní transkriptáza, který je schopen prodlužovat telomery v dostatečné délce nastavením druhově specifických sekvencí DNA (pro humánní telomery je to sled bází TTAGGG), což zajišťuje maligním buňkám „nesmrtelnost“. Její aktivita přímo koreluje s expresí její katalytické podjednotky – humane telomerase reverse transcriptase (hTERT). Vzhledem ke skutečnosti, že hTERT je exprimována až u 85-90% lidských malignit a že existuje velmi úzká souvislost mezi aktivitou telomerázy a maligním potencionálem maligních buněk, jeví se stanovení hladiny hTERT jako nadějný marker malignity. Bylo prokázáno, že hTERT je schopna vyvolat odpověď cytotoxických TL u mnoha nádorových onemocnění včetně karcinomu pankreatu.

Je považována za negativní prognostický parametr pro pankreatický karcinom, ačkoliv nižší hodnoty exprese byly spojeny s horším přežíváním nežli vyšší hodnoty exprese hTERT [59].

2.3.4. Význam stanovení minimální reziduální choroby pro onkologickou praxi.

Jako minimální reziduální chorobu tedy chápeme přítomnost nádorových buněk cirkulujících v organismu pacienta, u kterého byl úspěšně odstraněn primární nádor a současně nejsou zřejmé známky nádorového onemocnění. Detekci MRD je možno také využít k monitoringu úspěšnosti adjuvantní chemoterapie nebo monitoringu onkologických pacientů obecně. V rámci klinických studií lze využít MRD k sledování účinku nových protinádorových molekul, či jejich kombinací.

3. Experimentální část

3.1. Cíle práce

1. Posouzení významu CEA, hTERT a EGFR v detekci adenokarcinomu pankreatu metodou RT-PCR
2. Stanovení cut-off hodnot markerů GEA, EGFR, hTERT v břišní laváži
3. Vyhodnocení predikce léčebných výsledků u adenokarcinomu pankreatu

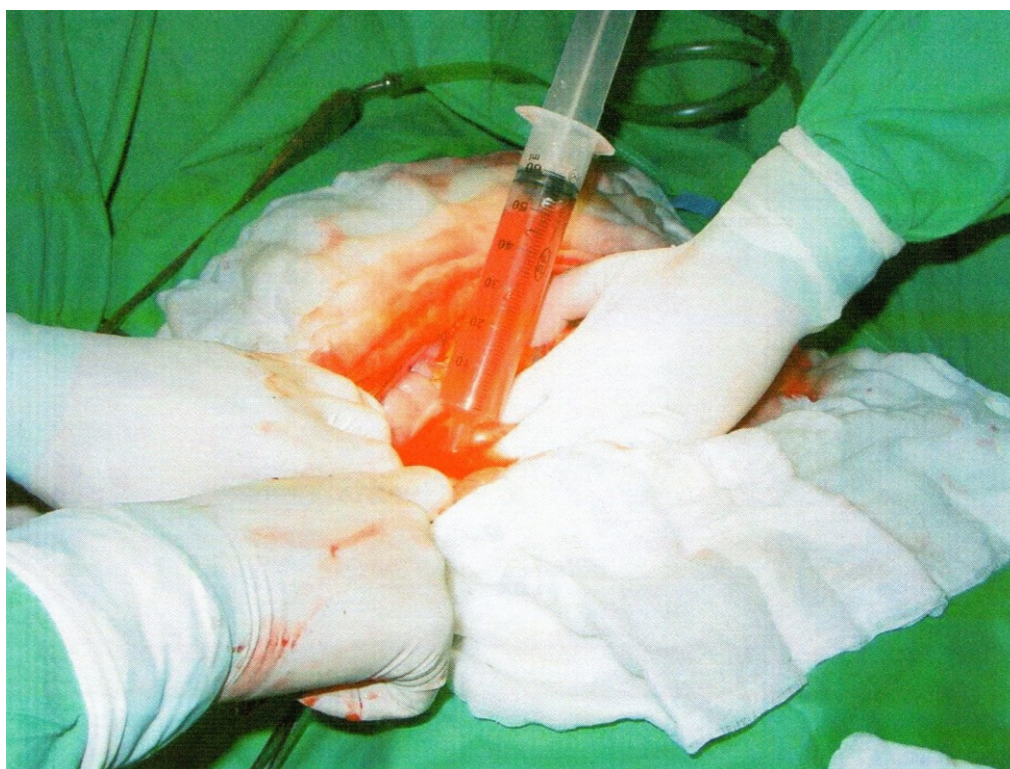
Expresi markerů lze stanovit u pacientů s karcinomem pankreatu v periferní a portální krvi, kostní dřeni a v peritoneální laváži. Ze spektra dostupných markerů nutno stanovit takové substance, které s dostatečnou senzitivitou a specifitou mohou diskriminovat mezi buňkami maligními a buňkami nemaligními. Dále je nutno standardizovat metodu real-time RT-PCR pro detekci těchto markerů.

3.2. Materiál a metoda

K vyšetření byly použity vzorky peritoneální laváže odebrané peroperačně u skupiny pacientů s karcinomem pankreatu. Ve skupině bylo 87 pacientů, průměrný věk 65 let s poměrem mužů a žen 1,2:1. Odběr byl prováděn v celkové anestézii v průběhu operačního výkonu. Pacient byl s touto skutečností seznámen a podepsal informovaný souhlas, jenž byl schválen Etickou komisí FN v Olomouci.

3.2.1. Materiál a jeho odběr

Vzorek peritoneální laváže je odebírán na počátku operačního výkonu ihned po provedení laparotomie. Do dutiny břišní je aplikováno cca 300 ml fyziologického roztoku temperovaného na tělesnou teplotu 37°C, který po dobu 5 minut omývá peritoneum a orgány dutiny břišní a následně je 200 ml laváže odesláno ve speciální nádobě s živným médiem – fetální bovinní sérum a EDTA - k vyšetření do laboratoře.



Obr. 4. Odběr vzorku peritoneální laváže

Vzorky peritoneální laváže byly získány u 87 nemocných s pokročilým adenokarcinomem pankreatu a u 24 kontrolních subjektů použitím 100ml fyziologického roztoku (phosphate buffered saline, pH=7,2) ihned po otevření břišní dutiny či v úvodu laparoskopického výkonu. Peritoneální laváž byla získána aspirací do sterilní stříkačky a poté přenesena do transportních lahví obsahujících 1,5 ml 0,5M EDTA a 10 ml fetálního bovinního séra. Odebraný materiál byl následně ihned transportován do Laboratoře experimentální medicíny.

3.2.2. Zpracování materiálu

RNA purifikace a reverzní transkripce

Celková RNA byla izolována ze sedimentu peritoneální laváže fenol-chloroformovou metodou za použití kitu TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA), postupovalo se dle návodu výrobce. Pro reverzní

transkripci byl použit 1 μ g získané RNA, po inkubaci s náhodnými hexamery (Promega, Madison, WI, USA) byla provedena reverzní transkripce za použití RevertAid Moloney Murine Leukemia Virus reverzní transkriptázy (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Real-time PCR

Real-time PCR amplifikace 100ng cDNA získané reverzní transkripcí byla provedena na přístroji Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Pro amplifikaci karcinoembryonálního antigenu (CEA, NM 004363), receptoru pro epidermální růstový faktor 1 (EGFR, NM 005228) a lidskou telomerázu (hTERT, NM 198253) byly navrženy specifické primery a taq-man sondy (Generi-Biotech, Hradec Králové, Česká republika). Samotná PCR reakce byla amplifikovaná polymerázou HotStart Taq Polymerase (AB Gene, Epsom, UK). Pro absolutní kvantifikaci byly připraveny plazmidové standardy pCR 2.1 Topo (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), které v ředění sloužily k sestavení kalibrační křivky. Změřené hodnoty genové exprese testovaných markerů byly normalizovány jak na množství RNA vstupující do reverzní transkripce, tak vzhledem k expresi housekeepingového genu glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH).

3.2.3. Statistické zpracování

Statistická analýza

Prahové, cut-off, hodnoty exprese CEA, EGFR a hTERT v peritoneální laváži byly stanoveny jako aritmetický průměr plus dvojnásobek směrodatné odchylky v souboru kontrolních zdravých subjektů. Exprese testovaných markerů u pacientů s adenokarcinomem pankreatu byly srovnány s hodnotami v kontrolním souboru prostřednictvím Wilcoxonova exaktního dvouvýběrového testu. Obě skupiny jsou porovnány rovněž graficky prostřednictvím krabicových grafů s vyznačenou prahovou hodnotou. Pro statistické výpočty a grafy byly použity softwary R (www.r-project.org) a STATISTICA (StatSoft, Inc., USA).

3.2.4. Soubor pacientů

Pacienti s adenokarcinomem pankreatu

Do studie bylo zařazeno 87 pacientů operovaných na I. chirurgické klinice FN Olomouc v letech 2007-2010 pro duktální adenokarcinom pankreatu ve stadiu III - IV (UICC) – lokálně inoperabilní či generalizovaní, u nichž byl proveden paliativní výkon (bypassová operace, odběr biologického materiálu pro následnou onkologickou léčbu) a zároveň byl získán materiál z laváže dutiny břišní. Diagnóza adenokarcinomu pankreatu byla ověřena histologicky a do studie byli zahrnuti pouze pacienti s pooperačním statusem R2 výkonu (tab. 1).

Kontrolní skupina

Kontrolní skupinu tvořilo 24 elektivně operovaných pacientů pro cholecystolithiasu bez známek akutního zánětu a bez nádorového onemocnění či anamnézy nádorového onemocnění, u nichž byla provedena v úvodu výkonu laváž dutiny břišní (tab. 1). Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Olomouci, pacienti podepsali informovaný souhlas.

	Počet	Pohlaví		Věk (medián)	Stádium		Grading			
		Muži	Ženy		III	IV	1	2	3	ND
Pacienti s adenokarcinomem pankreatu (R2)	87	49	38	65	26	61	1	26	44	16
Kontrolní skupina	24	8	16	50	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tab. 1. Charakteristika pacientů (ND nestanoveno)

3.3. Výsledky

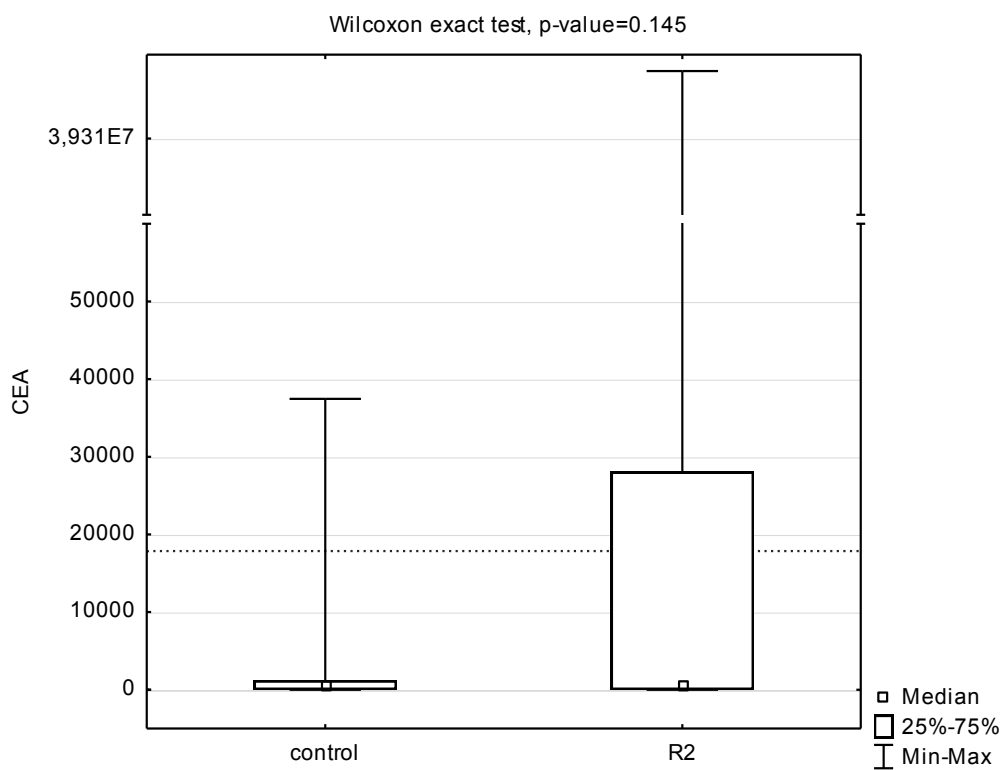
Průměrná exprese CEA byla 2501 kopií mRNA/ μ g RNA, EGFR byla 716749 kopií mRNA/ μ g RNA a hTERT 104 kopií mRNA/ μ g RNA v peritoneální laváži kontrolní skupiny (tab. 2). Prahové, cut-off hodnoty byly stanoveny jako „průměr + 2x směrodatná odchylka“. Hodnoty absolutní exprese byly dále normalizovány na expresi house-keepingového genu glycerlaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH). Cut-off hodnoty testovaných markerů po normalizaci byly 4,89 kopií mRNA genu/mRNA GAPDH pro CEA/GAPDH, 115,88 kopií mRNA genu/mRNA GAPDH pro EGFR/GAPDH a 0,02 kopií mRNA genu/mRNA GAPDH pro hTERT.

Bylo provedeno porovnání exprese CEA, EGFR a hTERT mezi kontrolní skupinou a pacienty s pokročilým adenokarcinomem pankreatu (R2). V případě absolutní exprese testovaných markerů, pouze hTERT dokáže statisticky významně ($p < 0,001$) odlišit obě analyzované skupiny, kdy pacienti s pokročilým adenokarcinomem pankreatu (R2) mají vyšší hodnotu exprese hTERT (obr. 9). Absolutní exprese CEA ani EGFR nedokáže odlišit obě skupiny.

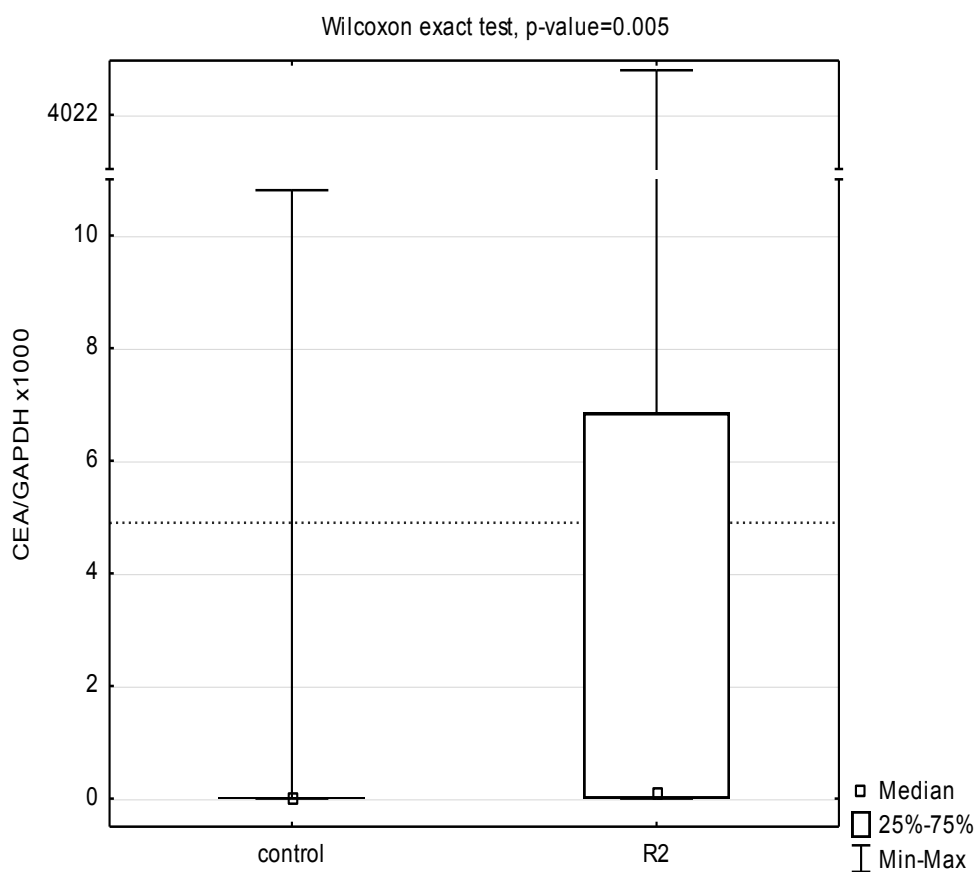
Za využití přesnějších, normalizovaných hodnot exprese testovaných markerů, byla prokázána statisticky významně vyšší exprese CEA a hTERT ($p < 0,005$, resp. $p < 0,001$) u pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu (R2) v porovnání s kontrolní skupinou (obr. 6 a 10).

Kategorie	Absolutní exprese genu (kopie mRNA genu/ μ g RNA)				Normalizovaná exprese genu (kopie mRNA genu/mRNA GAPDH)		
	CEA	EGFR	hTERT	GAPDH	CEA/GAPDH	EGFR/GAPDH	hTERT/GAPDH
Průměr	2501	716 749	104	125 248 876	0,49	25,42	0,0023
Směrodatná odchylka	7651	1 423 099	178	149 229 377	2,20	45,23	0,0078
Cut-off	17800	3 550 000	460	423 700 000	4,89	115,88	0,0200

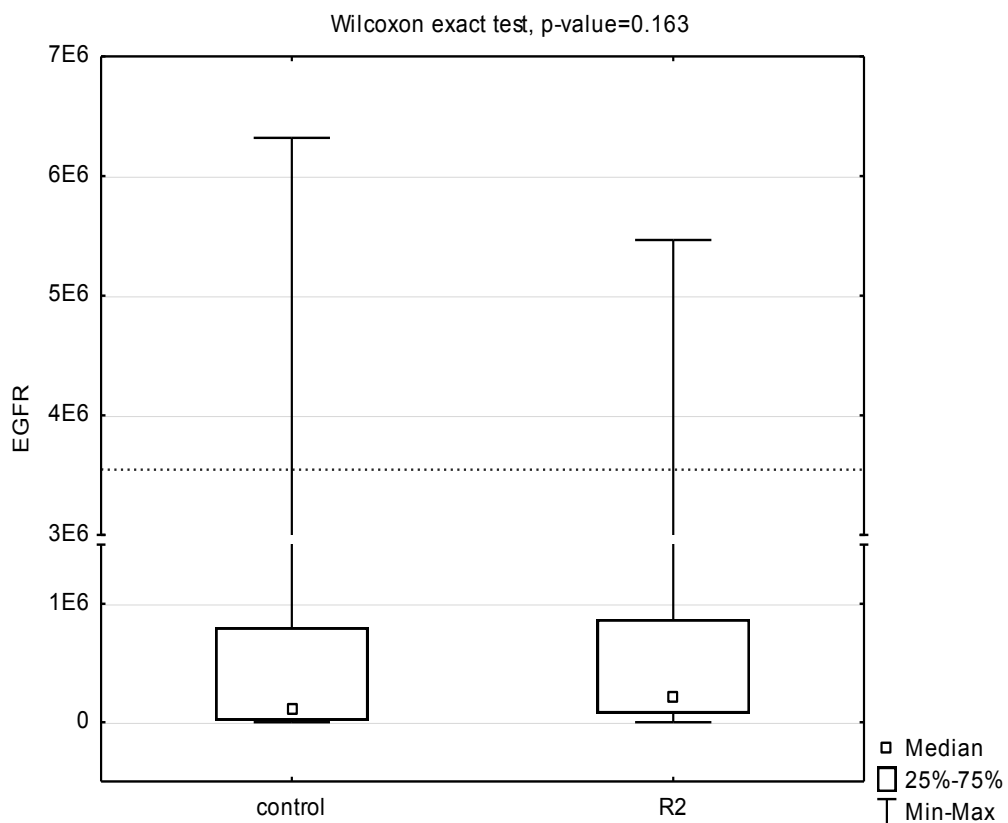
Tab. 2. Cut-off hodnoty exprese CEA, EGFR a hTERT v peritoneální laváži



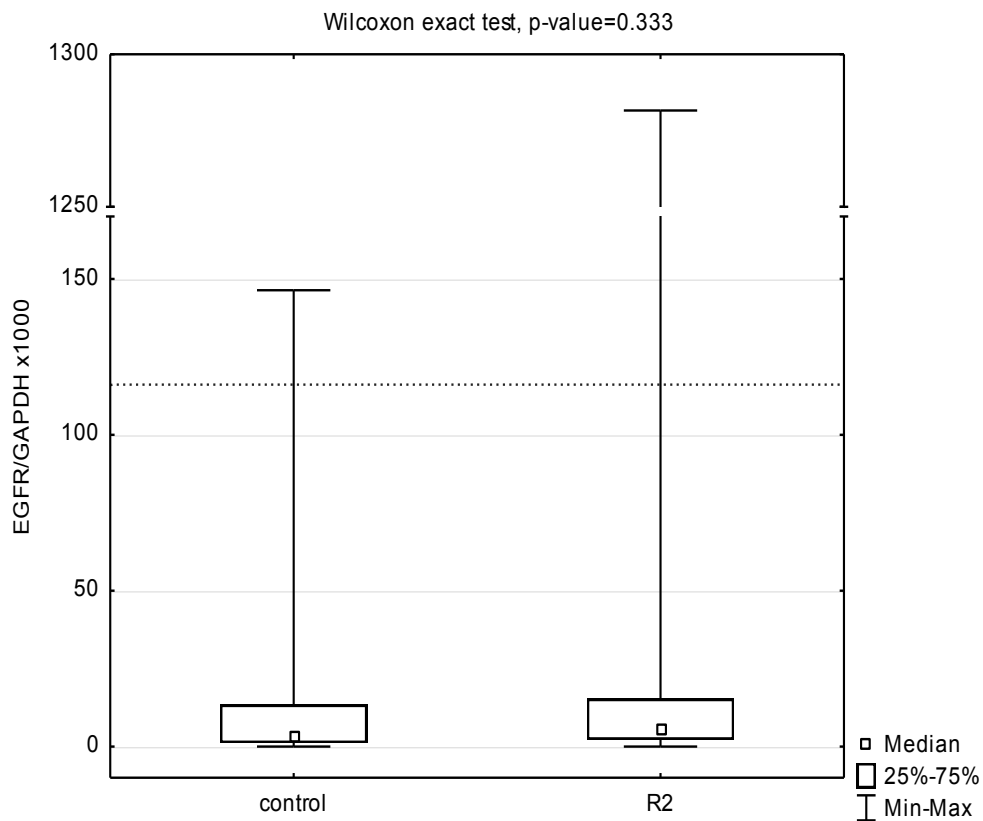
Obr. 5. Absolutní exprese CEA (kopie mRNA genu/ μ g RNA) ve skupině kontrol a pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu, přerušovaná linka představuje vypočtenou cut-off hodnotu



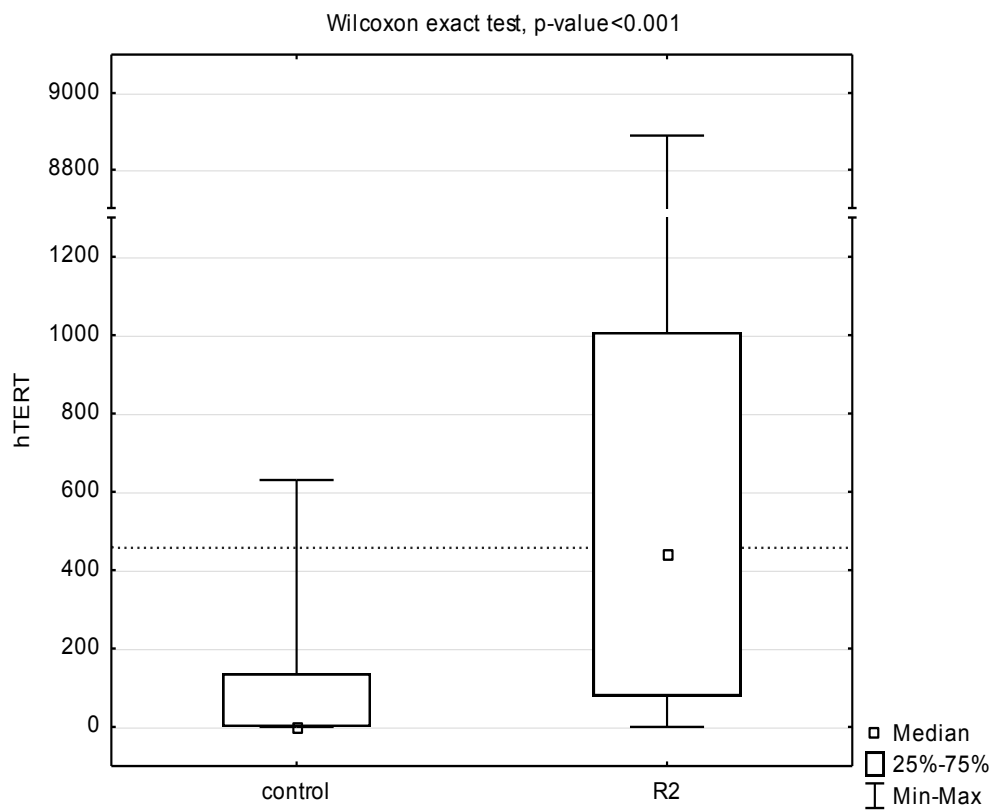
Obr. 6. Normalizovaná exprese CEA (kopie mRNA genu/ kopie mRNA GAPDH) ve skupině kontrol a pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu, přerušovaná linka představuje vypočtenou cut-off hodnotu



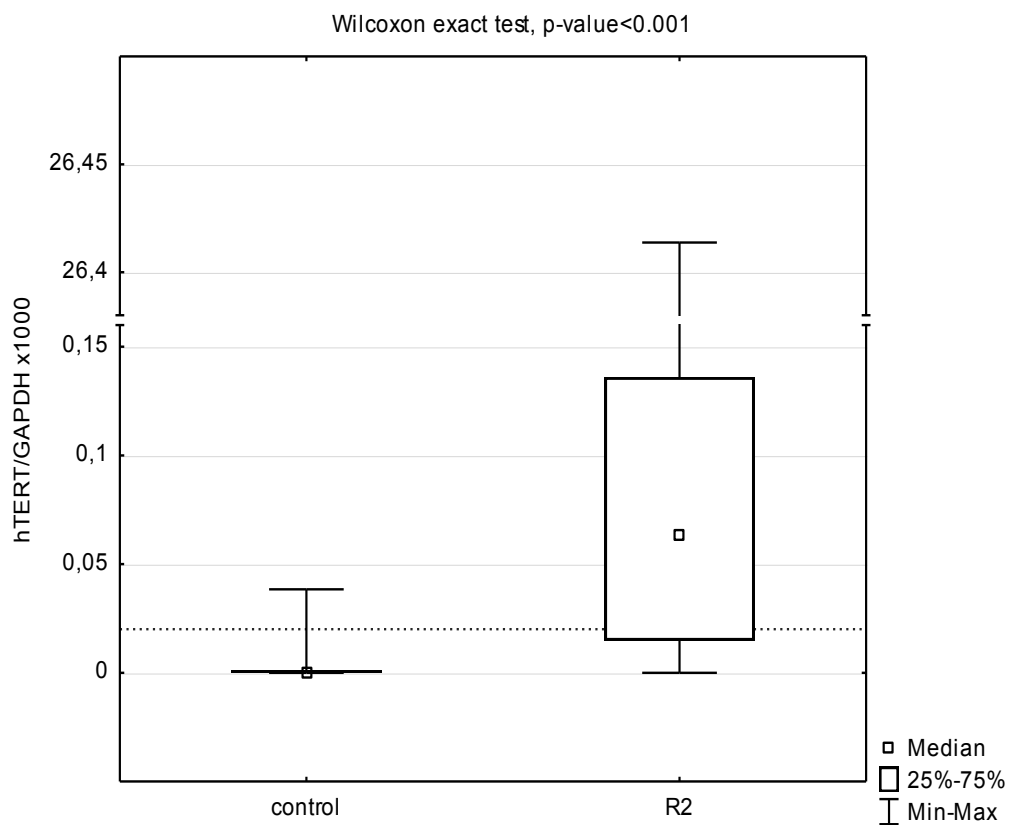
Obr. 7. Absolutní exprese EGFR (kopie mRNA genu/ μ g RNA) ve skupině kontrol a pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu, přerušovaná linka představuje vypočtenou cut-off hodnotu



Obr. 8. Normalizovaná exprese EGFR (kopie mRNA genu/ kopie mRNA GAPDH) ve skupině kontrol a pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu, přerušovaná linka představuje vypočtenou cut-off hodnotu



Obr. 9. Absolutní exprese hTERT (kopie mRNA genu/ μ g RNA) ve skupině kontrol a pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu, přerušovaná linka představuje vypočtenou cut-off hodnotu



Obr. 10. Normalizovaná exprese hTERT (kopie mRNA genu/ kopie mRNA GAPDH) ve skupině kontrol a pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu, přerušovaná linka představuje vypočtenou cut-off hodnotu

4. Souhrnné výsledky a diskuse

Všeobecně známé neuspokojivé výsledky v léčbě karcinomu pankreatu vedou k hledání nových možných cest řešení. Jedním z charakteristických rysů této malignity je skutečnost, že až u 80% pacientů v pooperačním období dojde k rozvoji lokální recidivy či vzdálených metastáz [60] a pětileté přežití bez léčby je tristní od 0,4% do 4% [61,62]. Podle aktuálních informací se odhaduje, že v roce 2014 byl v USA nově diagnostikován duktální adenokarcinom pankreatu u 46 000 pacientů, a pouze přibližně 6% z těchto pacientů přežije 5 let [63]. Z dostupné literatury lze hledat možné cesty zlepšení výsledků v následujících směrech - zlepšení operační techniky a možnosti diagnostiky, časná detekce minimální residuální choroby, hledání vhodného markeru schopného diskriminovat pacienty s predikcí rozvoje recidivy nebo metastáz karcinomu pankreatu a hledání rychlé, spolehlivé a neposlední řadě levné metody detekce těchto markerů, navržení nových konceptů adjuvantní terapie a cílené biologické léčby.

Zlepšení operační techniky je možné využitím bezdotykové preparační techniky (no-touch isolation technique) a případně extenzivní peroperační laváže dutiny břišní [64]. Jsou-li v průběhu operace zachována spádová cévní řečiště z tumoru pankreatu, pak při manipulaci s nádorem dochází k šíření maligních buněk do portální žíly, lymfatických cév a do dutiny břišní. Hirota a spol. operovali „no-touch“ technikou skupinu 8 pacientů a tuto skupinu komparovali se skupinou 10 pacientů operovaných klasickou technikou. U všech pacientů zjišťovali a analyzovali odebranou krev z portální vény před a po manipulaci s tumorem, paralelně byly vyšetřovány vzorky lymfatické tekutiny vytlačené z resekované rakovinné pankreatické tkáně. Detekce CEA mRNA byla pozitivní v 50 % případů operací běžnou technikou, recidiva činila 90% a medián přežití 21,2 +/-5,8 měsíce, ve skupině pacientů operovaných no-touch technikou se recidiva projevila u 38 % pacientů a medián přežití 41,5 +/-5,6 měsíce [64]. Přesvědčivé výsledky srovnání operačních technik mají však jen omezený význam, neboť k procesu disseminace pravděpodobně

dochází již v předoperačním období a možnosti další evoluce operačních postupů a technických modalit jsou prakticky vyčerpány.

Detekce minimální reziduální nemoci vyvolává otázku, zda jsou pacienti skutečně dostatečně léčeni primárním chirurgickým výkonem nebo zda by měla být navržena neoadjuvantní chemoterapie či radio-chemoterapie. Pro detekci MRD lze použít celou škálu metodických postupů, které se liší specificitou, senzitivitou, náklady i pracností. Na podkladě závěrů nečetných předcházejících studií jsme zvolili pro odběr vzorků peritoneální laváž, jako markery byly zvoleny CEA, EGFR a hTERT s detekcí na molekulární úrovni. Současné molekulární metody založené na PCR jsou nejcitlivější; real time RT-PCR může detekovat jako jedna z mála okultní nádorové buňky v 1×10^7 buňkách, a je zhruba o dva řády citlivější, než imunocytochemické metody. Takto poskytuje vynikající citlivost a, v závislosti na použitém nádorovém markeru, i specificitu [51].

Scheunemann a spol. zkoumali imunohistochemicky postižení lymfatických uzlin rutinně odstraněných při operacích pro karcinom pankreatu, které při histopatologickém vyšetření byly označeny jako „tumor-free“. V práci prokazuje, že izolované nádorové buňky nebo nádorové buněčné shluky byly detekovány v těchto lymfatických uzlinách v 32,5% případů. Z multivariální analýzy vyplývá, že přítomnost nádorových buněk v lymfatických uzlinách je nezávislým prognostickým faktorem pro signifikantní určení doby bez relapsu ($p=0,03$) a celkové přežití u karcinomu pankreatu [48].

Hoffmann a spol. analyzovali dynamiku transkripce genu CK-19 metodou fluorogenní RT-PCR v krvi v průběhu operačního výkonu ve vzorcích peritoneálních laváží u 30% pacientů a potvrdili, že množství detekovatelné CK-19 je vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou. Stejnou metodou zjišťovali hladinu CK-19 v peritoneálním výplachu. Prokázali nejen, že hodnoty CK-19 exprese jsou 10x vyšší u pacientů s karcinomem pankreatu ve srovnání s pacienty s chronickou pankreatitidou, ale také, že prevalence nádorových buněk v peritoneální laváži se významně zvyšuje se stadiem tumoru a snížením diferenciací ($p < 0,05$), a že cytokeratin-19 u pozitivních pacientů má

slabou tendenci ke kratší době přežití než kontrolní skupina ($p < 0,15$). Desetkrát vyšší hladiny exprese v peritoneální laváži u pacientů s karcinomem pankreatu v porovnání s pacienty s chronickou pankreatitidou ukázaly, že kvantitativní fluorogenní RT-PCR je vhodnou metodou pro rozlišování mezi maligním a benigním onemocněním pankreatu. Naproti tomu, cytokeratin 19 mRNA postrádá specifitu pro gastrointestinální tumory [65].

Soeth a spol. referují, že diseminované nádorové buňky karcinomu pankreatu mohou být detekovány na podkladě exprese CK 20 metodou RT-PCR a že nádorové buňky jsou zjistitelné v poměrně časném stadiu nemoci. Pozitivní detekce CK-20 v kostní dřeni nebo venózní krvi i u pacientů s buněčnou diferenciací G1 a G2 je signifikantním negativním prognostickým faktorem pro délku přežití ($p=0,045$). Analýza přežívání pacientů po resekci prokázala statisticky signifikantní přežívání vzhledem k radikalitě výkonu ($p=0,0001$), stádiu onemocnění dle UICC ($p=0,0011$) a prevalenci izolovaných nádorových buněk v krvi ($p=0,05$) [49].

Taniguchi a spol. ve své práci prokázali, že CEA mRNA pozitivita má dobrou korelaci s agresivní charakteristikou nádoru. Současná zjištění zvýšené frekvence cirkulujících nádorových buněk, jak je ukázáno přítomností CEA mRNA v krvi u pacientů s pokročilým stádiem kolorektálního karcinomu, je v souladu s dobře známým pozorováním, že pacienti s lokálně pokročilým onemocněním mají tendenci k rozvoji metastáz častěji. Doporučují použití RT-PCR, jako test pro stanovení hladiny CEA mRNA, jako velmi užitečný nástroj pro detekci nádorových buněk v periferní krvi pacientů s kolorektálním karcinomem, a přítomnost nádorových buněk v periferní krvi může být spolehlivým novým prognostickým faktorem [66]. Tento závěr koreluje se závěry i jiných autorů, mimo jiné i v naší práci jsme dospěli k závěru, že exprese CEA ($p=0,005$) v peritoneální laváži byla spojena s kratším celkovým přežíváním pacientů s karcinomem pankreatu – tedy přítomnost nádorových buněk v peritoneální laváži na základě exprese CEA představuje negativní prognostický faktor pro přežití u nemocných s karcinomem pankreatu.

Publikace zaměřené na prognosticky významné hodnoty cirkulujících nádorových buněk (CTCs) metodou PCR v peritoneální laváži pacientů s

karcinomem pankreatu jsou nepočtené a výsledky často nejednoznačné [48,58,67,68]. Eguchi a spol. prokázali metodou PCR pozitivitu CEA v peritoneálních vzorcích laváží u 21,7% (15/69) pacientů s rakovinou slinivky břišní, a tito pacienti měli kratší dobu přežití bez progresu onemocnění i celkovou dobu přežití ($p = 0,004$ a $p = 0,01$) [67]. Broll a spol. rovněž referují o vysoké pozitivitě CEA (63%) v peritoneální laváži pacientů s karcinomem pankreatu, ale současně nedoporučují metodu PCR založené na analýze CEA transkriptů pro detekci CTCs v peritoneálním výplachu pro vysoké falešně pozitivní výsledky (38%) u kontrolních vzorků peritoneální laváže zdravých osob [68]. Příčinou rozdílných výsledků i závěrů jsou různé použité metody, různý výběr markerů a malé soubory testovaných vzorků pacientů [51].

Klos a spol. zjistili statistickou souvislost mezi expresí EGFR v portální krvi a klinickým stadiem ($p < 0,006$), expresí EGFR v portální krvi a stupněm diferenciacie primárního tumoru ($p < 0,045$), dále byla prokázána vysoká exprese EGFR v peritoneální laváži u pacientů s metastatickým postižením oproti pacientům bez přítomnosti metastáz ($p < 0,015$), exprese EGFR ($p = 0,01$) byla spojena s kratším celkovým přežíváním pacientů s karcinomem pankreatu [52].

V této studii byla prokázána statisticky významně vyšší absolutní exprese hTERT ($p < 0,001$) a normalizovaná exprese CEA a hTERT ($p < 0,005$, resp. $p < 0,001$) v peritoneální laváži u pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu (R2) v porovnání s kontrolní skupinou a EGFR. Exprese EGFR jak absolutní tak normalizovaná nelze použít k odlišení obou studovaných skupin.

Konvenční cytologie, imunohistochemie i molekulárně-biologické metody zatím tedy poskytují rozporuplné výsledky v případě prognostického významu CTCs. Je zřejmé, že další pokrok v této oblasti úzce souvisí s potřebou standardizace metod a postupů, s validací výsledků v nezávislých ověřovacích studiích a s vývojem nových detekčních metod s optimální senzitivitou a specificitou umožňující přímou vizualizaci a následnou charakterizaci detekovaných nádorových buněk.

Cílem této studie bylo stanovit hodnoty exprese CEA, EGFR a hTERT jako potenciálních markerů okultních nádorových buněk u nemocných s pokročilým karcinomem pankreatu v abdominální laváži – kompartmentu břišní dutiny – a hodnoty exprese týchž markerů u kontrolní skupiny [51,57,58,59]. Ke stanovení bylo využito metod založených na principu RT – PCR.

Předpokladem studie byla hypotéza, že přítomnost markerů nádorových buněk v populaci zdravé a v populaci s pokročilým karcinomem pankreatu bude rozdílná. Záměrem je využitím zmíněné metodiky ověřit diskriminační schopnosti těchto markerů pro skupinu nemocných s pokročilým karcinomem.

Ačkoliv část naší skupiny prokázala nedávno statisticky významné rozdíly v expresi EGFR u nemocných s metastatickým postižením oproti nemocným s lokalizovaným onemocněním jak v portální krvi, tak v abdominální laváži, současná studie porovnáním těchto výsledků s kontrolní zdravou skupinou zjišťuje, že není statisticky významný rozdíl v expresi tohoto markeru mezi oběma nyní sledovanými skupinami [51,58]. Klos a spol. prokázali zvýšenou expresi EGFR u pokročilých stadií karcinomu pankreatu a statisticky významně vyšší u pokročilých stadií oproti méně pokročilým stadiím, i v korelaci s dobou přežití. Havlík a spol. prokázali že EGFR a CEA pozitivita v peritoneální laváži koresponduje s klinickým stadiem a gradem tumoru ale i kratším přežitím u pokročilých stadií. Za překvapivý výsledek považujeme zjištění zejména u EGFR v naší studii. Ta ukazuje na srovnatelnou expresi jak absolutní tak normalizovanou v obou skupinách a tím velmi limituje využití exprese EGFR jako markeru okultních nádorových buněk v abdominální laváži. U markeru CEA jsme prokázali sice rozdílnou expresi v kontrolní skupině a u nemocných s pokročilým karcinomem pankreatu jak absolutní tak normalizovanou, nicméně statisticky významný rozdíl byl jen u normalizované. Toto je ve shodě s publikovanými závěry Brolla a spol., který rovněž referuje o vyšší pozitivitě CEA (63 %) v peritoneální laváži pacientů s karcinomem pankreatu, ale současně poukazuje na vysokou míru falešně pozitivních výsledků (38 %) u kontrolních vzorků peritoneální laváže u

zdravých osob [68]. Výsledky naší studie potvrzují schopnosti diferenciaci mezi zdravou skupinou a skupinou s pokročilým karcinomem pankreatu – stadia III a IV jen u markeru hTERT, kdy byla prokázána statisticky významně vyšší absolutní exprese hTERT ($p < 0,001$) a normalizovaná exprese CEA a hTERT ($p < 0,005$, resp. $p < 0,001$) v peritoneální laváži u pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu (R2) v porovnání s kontrolní skupinou. Aktuálně Campa a spol. potvrdil, že polymorfismus v genu TERT je spojený s rizikem karcinomu pankreatu na základě hloubkové analýzy genetické variability TERT u subjektů s karcinomem pankreatu a kontrolního souboru [69]. Expresi EGFR jak absolutní tak normalizovanou v naší studii nelze použít k odlišení obou studovaných skupin. Absolutní exprese CEA též nevykazovala statisticky signifikantní rozdíly u obou skupin. Konvenční cytologie, imunohistochemie i molekulárně-biologické metody zatím tedy poskytují rozporuplné výsledky v případě prognostického významu okultních nádorových buněk v peritoneální laváži u pacientů s adenokarcinomem pankreatu. Je zřejmé, že další pokrok v této oblasti úzce souvisí s potřebou standardizace metod a postupů, s validací výsledků v nezávislých ověřovacích studiích a s vývojem nových detekčních metod s optimální senzitivitou a specifitou umožňující přímou vizualizaci a následnou charakterizaci detekovaných nádorových buněk.

Lze tedy říci, že na základě prezentovaných výsledků pro detekci nádorových buněk u adenokarcinomu pankreatu v abdominální laváži využitím RT-PCR by mohl být použitelný marker hTERT, naopak průkaz exprese CEA a EGFR nesplňuje požadavky na odlišení kontrolní zdravé skupiny od skupiny s pokročilým adenokarcinomem pankreatu.

5. Závěr

Cílem prezentované práce bylo stanovení cut-off hodnot exprese nádorových markerů CEA, EGFR a hTERT pro detekci okultních nádorových buněk v kompartmentu peritoneální dutiny u kontrolní skupiny pacientů (bez nádoru, bez zánětu, odběr při elektivní laparoskopické cholecystektomii) a aplikace získaných cut-off hodnot na souboru nemocných s pokročilým duktálním adenokarcinomem pankreatu.

Výhodou popsaného postupu oproti moderním metodám přímé diagnostiky je rychlost, nízké náklady, přítomnost vybavení téměř na každém pracovišti patologie, vyšší citlivost a analýza celého vzorku bez předchozí preselekce a rizika falešně negativních výsledků. Metodika identifikuje markery přítomné pouze v živých nádorových buňkách, proto jejich detekce v biologickém materiálu nepřímo svědčí pro přítomnost CTCs ve vzorku.

Expresce hTERT v peritoneální laváži jak absolutní tak normalizovaná dosahuje statisticky signifikantního rozdílu a mohla by tak být kandidátním markerem pro identifikaci pacientů s pokročilým pankreatickým adenokarcinomem a malým benefitem z radikálního chirurgického výkonu. Další studie se zaměřením na hTERT budou nutné k potvrzení tohoto závěru. V dané studii však byl zjištěn prakticky zanedbatelný rozdíl jak v absolutní, tak normalizované expresi EGFR v peritoneální laváži a též nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v absolutní expresi CEA u kontrolní skupiny a u nemocných s pokročilým adenokarcinomem pankreatu.

6. Souhrn

Východisko: Cílem práce je posoudit význam CEA, hTERT a EGFR v predikci léčebných výsledků u adenokarcinomu pankreatu, včetně stanovení cut-off hodnot jednotlivých markerů v břišní laváži.

Soubor pacientů a metodika: Práce porovnává skupinu 87 pacientů operovaných pro duktální adenokarcinom pankreatu ve stadiu III - IV (UICC) u nichž byl proveden paliativní výkon (biliodigestivní spojka, odběr biologického materiálu pro následnou onkologickou léčbu) s kontrolní skupinou 24 pacientů bez nádoru a zánětu. Celková RNA všech vzorků byla purifikována a zpracována procesem reverzní transkripce. Okultní nádorové buňky v peritoneální laváži byly detekovány real-time RT-PCR metodou využitím CEA, EGFR a hTERT jako markerů nádorových buněk. Sekundárním cílem studie bylo stanovení cut-off hodnot exprese těchto markerů. Pro statické analýzy byly použity softwary R (www.r-project.org) a Statistica (StatSoft, Inc., USA).

Výsledky: Průměrná exprese CEA, EGFR a hTERT v peritoneální laváži kontrolní skupiny byla 2501, 716749, resp. 104 kopií mRNA/ μ g RNA. Prahové, cut-off hodnoty, byly stanoveny jako „průměr + 2x směrodatná odchylka“. Hodnoty absolutní exprese byly dále normalizovány na expresi house-keepingového genu glycerladehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH). Cut-off hodnoty testovaných markerů po normalizaci byly 4,89, 115,88, resp. 0,02 kopií mRNA genu/kopií mRNA GAPDH. V případě absolutní exprese testovaných markerů, pouze hTERT dokáže statisticky významně ($p < 0,001$) odlišit obě analyzované skupiny, kdy pacienti s pokročilým adenokarcinomem pankreatu mají vyšší hodnotu exprese hTERT. Absolutní exprese CEA ani EGFR nedokáže odlišit obě skupiny. Použitím přesnějších, normalizovaných hodnot exprese testovaných markerů byla prokázána statisticky významně vyšší exprese CEA a hTERT ($p < 0,005$, resp. $p < 0,001$) u pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu v porovnání s kontrolní skupinou.

Závěr: Absolutní exprese hTERT v peritoneální laváži pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu byla signifikantně vyšší v porovnání

s kontrolní skupinou. Naopak absolutní exprese CEA a EGFR nebyla signifikantně rozdílná.

7. Summary

Background: The incidence and mortality of pancreatic cancers has been rising steadily. Only a small portion of tumours (15 to 20%) are localized and therefore have the chance of a curative resection. The accuracy of preoperative diagnosis is not sufficient, with understaging being a frequent problem. Reliable markers of both resectable and advanced disease have not been established. The aim of this study is to assess the significance of CEA, hTERT and EGFR in predicting treatment outcomes in pancreatic cancers, as well as determining the cut-off values of these markers individually in a peritoneal lavage.

Patients and Method: The study compared 87 patients undergoing palliative operations (bypass surgery, biological sampling material for subsequent oncological treatment) for either stage III or IV (UICC) pancreatic ductal adenocarcinomas with a control group of 24 patients undergoing an elective cholecystectomy without signs of acute inflammation, and no history of cancer. All data was collected from the 1st Surgical Department, University Hospital Olomouc, from 2007 to 2010. Abdominal cavity lavage was performed at the beginning of the surgery in both groups, using 100 ml of physiological solution (phosphate buffered saline, pH 7.2). The samples were then placed into transport bottles containing 1.5 ml 0.5 M EDTA and 10 ml of fetal bovine serum. Total RNA samples were all processed and purified by reverse transcription. Occult tumour cells in the peritoneal lavage were detected by real-time RT-PCR method using CEA, EGFR and hTERT as markers of tumour cells. Another aim was to calculate the cut-off values of these markers. Statistical analysis was done using software R (www.r-project.org) and Statistica (StatSoft, Inc. USA).

Results: Mean expression of CEA, EGFR and hTERT in peritoneal lavage in the control group was 2501,716749 and 104 copies of mRNA / mg RNA. Threshold, cut-off values were determined as "average + 2 standard deviation". Absolute expression values were further normalized to expression of the house-keeping gene glycerlaldehdyd-3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH). Cut-off values tested markers for standardization were 4,89, 115,88, and 0,02 copies of mRNA/GAPDH mRNA. Expression of CEA, EGFR and hTERT was compared between the control group and patients with advanced (unresectable or generalized) adenocarcinoma of the pancreas. In case of the absolute expression of the markers tested, only hTERT can statistically significantly ($p < 0,001$) distinguish analysed groups, where patients with advanced pancreatic adenocarcinoma had a higher expression of hTERT. Absolute expression of CEA or EGFR can not discriminate between the two groups. For precise use, normalized expression values of the test markers demonstrated a statistically significantly higher expression of hTERT ($p < 0,005$) and CEA ($p < 0,001$) in patients with advanced adenocarcinoma in comparison to control group.

Conclusion: Absolute hTERT expression in peritoneal lavage of patients with advanced pancreatic cancer was significantly higher compared to the control group.

8. Seznam použité literatury

1. Leffler J.: Karcinom pankreatu 2005 - Současný stav problematiky diagnostiky a léčby. *Interní medicína pro praxi* 7-8, 2005:360-363
2. Fernandes-de-Castillo C, Jimenez RE, Steer ML.: Surgery in treatment of treatment of exocrine pancreatic cancer and prognosis. *Up do day v.* 18, 2. 2010
3. *Novotvary 2001*: ISSN: 80-7280-418-9, 2001:69
4. *Novotvary 2011*: ISSN: 1210-857X, (0862-576X, 0862-5778):69
5. <http://www.svod.cz>
6. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, et al.: GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence a úmrtnost ve světě: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, Francie: Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny; 2013. Dostupné z: <http://globocan.iarc.fr>, přístup 13/12/2013
7. Farrow B, Evers BM.: Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surgical Oncology*, 2000, 10:153-169
8. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Lankisch PG.: Chronic pancreatitis and other risk factors for pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1999, 28: 673-685
9. Cuzik J, Babiker AG.: Pancreatic cancer, alcohol, diabetes mellitus and gallbladder disease. *Int J Cancer*, 43, 1989:280-284
10. Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong SM, Yu J, et al.: Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*. 2012, 142:730-739
11. Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP et al.: Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group, *J Natl Cancer Inst* 1997, 89(6):442-446
12. McFaul CD, Greenhalf W, Earl J et al.: Anticipation in familial pancreatic cancer. *Gut* 2006, 55(2):252-258

13. Giardiello FM, Brensiger JD, Tersmette AC, et al.: Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers Syndrome. *Gastroenterology* 2000, 119(6):1447-1453
14. Novotny I.: Precancerous Conditions and Risk Factors for Pancreatic and Bile Duct Cancer. *Klin Onkol* 2013, 26(Suppl):29-33
15. Morris JT, Wang SC, Hebrok M. KRAS, Hedgehog.: Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer*. 2010, 10:683-695
16. Tomasetti C, Vogelstein B.: Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*, 2015, Vol 347:78-
17. Karlson BM, Ekbohm A, Lingren PG et al.: Abdominal US for diagnosis of pancreatic tumor: a prospective cohort analysis. *Radiology*, 1999:213-107
18. Catalano C, Pavone P, et al.: Panvreatic adenocarcinoma: combination of MR imaging, MR angiography and MR cholangiopancreatography for the diagnosis and assesment of resecability. *Eur.radiol*. 1998, 8:428-434
19. Trede M.: Ultrafast magnetic resonance imaging improves the staging of pancreatic tumors. *J Nucl Med*, 1997, 226:229-235
20. Koranda P., Buriankova E, Formanek R, Kysucan J, Havlik R, et al.: 18F-FDG PET/CT in Pancreatic Carcinoma: Diagnosis and Staging. *Ces Radiol* 2010, 64(3): 185-191
21. El Oubeidi MA, Chen VK, El Toum IA, et al.: Endoscopic ultrasound – guided fine needle aspiration biopsy of patients with suspected pancreatic cancer: diagnostic accuracy and acute and 30-day complications. *Am J Gastroenterol*, Mertz HR, Sechopoulos P, Delbeke D, Leach SD. EUS, PET, and CT scanning for evaluation of pancreatic adenocarcinoma. *Gastrointest Endosc* 200, 52:367-371
22. Mertz HR, Sechopoulos P, Delbeke D, Leach SD.: EUS, PET, and CT scanning for evaluation of pancreatic adenocarcinoma. *Gastrointest Endosc* 200, 52:367-371

23. Zavoral M, Šálek C.: Racionální diagnostika karcinomu pankreatu. 2005, www.zdravi.e15.cz
24. Ardengh JC, Malheiros CA, Pereira V et al.: Endoscopic Ultrasound–Guided Fine-Needle Aspiration using Helical Computerized Tomography for TN Staging and Vascular Injury in Operable Pancreatic Carcinoma. JOP 2009, 10:310-317
25. Loveček M, Kliment M, Skalický P, Klos D, Tozzi di Angelo I, et al.: Význam endosonografie v předoperačním managementu nemocných s karcinomem hlavy pankreatu. Rozhl Chir 2012,91:608-613
26. Rosch T.: Differential diagnosis of pancreatic lesions: basic, EUS and other tests. UEGW 2010, Postgraduate course.
27. Petr WT, Pistes MD, Wayne A, et al.: Effect of preoperative biliary decompression on pancreaticoduodenectomy – associated morbidity in 300 consecutive patients. Ann Surg. 2001, 234:47-55
28. Morris JT, Wang SC, Hebrok M.: KRAS, Hedgehog Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. Nat Rev Cancer. 2010, 10:683-695
29. Collins MA, Brisset JC, Zhang Y, Bednar F, Pierre J, et al.: Metastatic pancreatic cancer is dependent on oncogenic K-ras in mice. Plos One, 2012:7
30. Zimmermann G, Papke B, Ismail S, Vartak N, Chandra A, et al.: Small molecule inhibition of the Kras-PDEdelta interaction impairs K-ras signalling. Nature. 2013:497:638-642
31. Cowley MJ, Chang DK, Pajic M, Johns AL, Waddell N, et al.: Understanding pancreatic cancer genomes. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2013:20(6):549-556
32. Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truit M, et al.: Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. Nat Med. 2011:17:500-503
33. Kolar Z.: Basic data concerning molecular mechanisms of development of some epithelial, solid mesenchymal and neuroectodermal cancers. Klin Onkol.(17), 3/2004:77-84

34. TNM Classification of Malignant Tumours, 7th Edition, ISBN: 978-1-4443-3241-4, Wiley-Blackwell, 2009.
35. The Sixth Edition of Pancreatic Cancer by Japan Pancreas Society 2009, Suizo, The Journal of the Japan Pancreas Society, Volume 24, 2009.
36. Ryska M.: Pancreatic cancer – surgical treatment strategy. *Onkologie* 2010;4(6):333-337
37. Lovecek M, Klos D, Skalický P, Kysucan J, Neoral C, et al.: Surgery for cancer of head of pancreas and survival analysis. *Onkologie* 2010;4(6) 338-341
38. Burris HA III, Moore MJ, Andersen J, et al.: Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreatic cancer: A randomized trial. *J Clin Oncol* 1997, 15:2403-2413
39. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, et al.: Erlotinib Plus Gemcitabine Compared with Gemcitabine Alone in Patients with Advanced Pancreatic Cancer: A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007, May 20, 25:1960-1966
40. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al.: Folfirinox versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 2011, 364:1817-1825
41. von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, et al.: Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med*, 2013, 369:1691-1703
42. Saiki Y, Horii A.: Molecular pathology of pancreatic cancer
43. Romsdahl MM, Valaitis J, McGrath RG, McGrew EA.: Circulating tumor cells in patients with carcinoma. Method and recent studies. *JAMA*. 1965;193:1087–1090.
44. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, et al.: Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:1419–1424.
45. Weiss L.: Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res* 1990;54:159–211.

46. Fidler IJ.: The biology of human cancer metastasis. *Acta Oncol* 1991;30:669–75.
47. Lundy J.: Anesthesia and surgery: a double-edged sword for the cancer patient. *J Surg Oncol* 1980;14:61–5.
48. Scheunemann P, Stoecklein NH, Rehders A, Bidde M, Metz S, et al.: Occult tumor cells in lymph nodes as a predictor for tumor relapse in pancreatic adenocarcinoma. *Langebecks Arch Surg* (2008) 393:359-365
49. Soeth E, Grigoleit U, Moellmann B, Roder Ch, Schniewind B, et al.: Detection of tumor cell dissemination in pancreatic ductal carcinoma patients by CK-20 RT-PCR indicates poor survival. *J Cancer Res Clin Oncol* (2005) 131:669-676
50. Vogel I, Kruger U, Marxsen J, Soeth E, Kalthoff H, et al.: Disseminated tumor cells in pancreatic patients detected by immunocytology: A new prognostic factor. *Clinical Cancer Research*, (March 1999), Vol 5:593-599
51. Havlik R, Srovnal J, Klos D, Benedikova A, Lovecek M, et al.: Occult tumour cells in peritoneal Lavage are a negative prognostic factor in pancreatic cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013 Sep;157(3):233-8.
52. Klos D, Loveček M, Srovnal J, Benedíková A, Růžková V, et al.: Možnosti využití stanovení minimální reziduální choroby u adenokarcinomu pankreatu pomocí metodiky real-time RT-PCR – pilotní studie. *Časopis lékařů českých* 2010, 149 (2):69-73
53. Yamada S, Takeda S, Fujii T, Nomoto S, Kanazumi N, et al.: Clinical implications of peritoneal cytology in potentially resectable pancreatic cancer: positive peritoneal cytology may not confer an adverse prognosis.
54. Demeure MJ, Doffek KM, Komorowski RA, Wilson SD.: Adenocarcinoma of the pancreas. Detection of occult metastases in regional lymph nodes by a polymerase chain reaction-based assay. *Cancer* 1998,83:1328-1334

55. Su D, Yamaguchi K, Tanaka M.: The characteristics of Disseminated tumor cells in pancreatic cancer: a black box needs to be explored.
56. Kanemitsu K, Hiraoka T, Tsuji T, Inoue K, Takamori H.: Implication of micrometastasis of lymph nodes in patients with extended operation for pancreatic cancer. *Pancreas* 2003, 26:315-321
57. Eguchi H, Ohigashi H, Takahashi H, et al.: Presence of minute cancer cell dissemination in peritoneal lavage fluid detected by reverse transcription PCD is an independent prognostic factor in patients with resectable pancreatic cancer. *Surgery* 2009; 146: 888-895.
58. Klos D, Loveček M, Srovnal J, Benedíková A, Růžková V, et al.: Možnosti využití stanovení minimální reziduální choroby u adenokarcinomu pankreatu pomocí metodiky real-time RT-PCR – pilotní studie. *Časopis lékařů českých* 2010, 149 (2):69-73
59. Grochola LF, Greither T, Taubert HW, Möller P, Knippschild U, et al.: Prognostic relevance of hTERT mRNA expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Neoplasia*. 2008 Sep;10(9):973-6.
60. Griffin JF, Smalley SR, Jewell W, Paradelo JC, Raymond RD, et al.: Patterns of failure after curative resection of pancreatic carcinoma. *Cancer*. 1990,66:56-61
61. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, et al.: Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin*. 2003,53:5-26
62. Bramhall SA, Allum WH, Jones AG, Allwood A, Cummins C, Neoptolemos JP.: Treatment and survival in 13 560 patients with pyncreatic cancer, and incidence of the disease, in the West Midlands: an epidemiological study. *Br J Surg*. 1995,82:111-115
63. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, et all.: Cancer treatment and survivorship statistics. 2014, *CA Cancer J Clin* 2014, 64:252-271
64. Hirota M, Shimada S, Yamamoto K, Tanaka E, Sugita H, et al.: Pancreatectomy using the no-touch isolation technique followed by extensive intraoperative peritoneal lavage to percent cancer cell dissemination: A pilot study. *JOP. J Pancreas* 2005, 6 (2):143-151

65. Hoffmann K, Kerner Ch, Wilfert W, Mueller M, Thiery J, et al.: Detection of disseminated pancreatic cells by amplification of cytokeratin-19 with quantitative RT-PCR in blood, bone marrow and peritoneal lavage of pancreatic carcinoma patients. *World J Gastroenterol* (2007), 2:257-263
66. Taniguchi T, Makino M, Suzuki K, et al.: Prognostic Significance of Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Measurement of Carcinoembryonic Antigen mRNA Levels in Tumor Drainage Blood and Peripheral Blood of Patients with Colorectal Carcinoma. *Am Cancer Soc.* (2000),5:970-976
67. Eguchi H, Ohigashi H, Takahashi H, et al.: Presence of minute cancer cell dissemination in peritoneal lavage fluid detected by reverse transcription PCD is an independent prognostic factor in patients with resectable pancreatic cancer. *Surgery* 2009; 146: 888-895.
68. Broll R, Weschta M, Windhoevel U, Berndt S, Schwandner O, et al.: Prognostic significance of free gastrointestinal tumor cells in peritoneal lavage detected by immunocytochemistry and polymerase chain reaction. *Langenbeck's Arch Surg* (2001) 386:285-292
69. Campa D, Rizzato C, Stolzenberg-Solomon RZ, et al.: The TERT gene harbors multiple variants associated with pancreatic cancer susceptibility. *Int J Cancer* 2015;137:2175-83.

9. Přehled publikací a přednášek autora

1. Ghothim M, Havlik R, Skalicky P, Klos D, Vrba R, Straznicka J, Skopal L, Neoral C, Lovecek M. Synchronous cancer duplicities of pancreas and stomach/kidney and their surgical treatment. *Rozhl Chir* 2015, 94(6):251-255
2. Havlik R, Srovnal J, Klos D, Benedikova A, Lovecek M, Ghothim M, Cahova D, Neoral C, Hajduch M. Occult tumour cells in peritoneal lavage are a negative prognostic factor in pancreatic cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013, 157(3):233-238
3. Ghothim M, Srovnal J, Bébarová L, Tesaříková J, Skalický P, Klos D, Prokopová A, Vahalíková M, Slavík H, Vrbková J, Neoral C, Havlík R, Hajdúch M, Loveček M. Stanovení exprese CEA, EGFR1 a hTERT pro detekci okultních nádorových buněk v peritoneální laváži u pacientů s adenokarcinomem pankreatu. Poster. XVII. Setkání českých a slovenských chirurgů na Moravě. 2015, Nové Město na Moravě.
4. Loveček M, Skalický P, Klos D, Neoral C, Vrba R, Ghothim M, Švébišová H, Strážnická J, Melichar B, Havlík R. Karcinom pankreatu – dlouhodobé výsledky chirurgické léčby. XVII. Setkání českých a slovenských chirurgů na Moravě. 2015, Nové Město na Moravě.
5. Ghothim M, Srovnal J, Bébarová L, Tesaříková J, Skalický P, Klos D, Prokopová A, Vahalíková M, Slavík H, Vrbková J, Neoral C, Havlík R, Hajdúch M, Loveček M. Stanovení exprese CEA, EGFR1 a hTERT pro detekci okultních nádorových buněk v peritoneální laváži u pacientů s adenokarcinomem pankreatu metodou RT-PCR. *Rozhl Chir* 2015:94, In print.
6. Havlik R, Lovecek M, Klos D, Ghothim M, Neoral C. Synchronous invasive ductal pancreatic adenocarcinomas and its clinical importance. *Onkologie* 2010, 4(6):342-343

7. Loveček M, Skalický P, Klos D, Neoral Č, Ehrmann J, Jr., Zapletalová J, Švébišová H, Yogeswara Y, Ghothim M, Vrba R, Havlík R.: Resekabilní karcinom pankreatu – 5leté přežití. Rozhl Chir 2015;94:in print

10. Přílohy

Seznam vyobrazení

Graf 1: Index růstu incidence 1977 – 2011 v České republice

Graf 2: Věkově standardizovaná incidence na 100 000 osob ve světové populaci.

Graf 3: Vývoj incidence a mortality karcinomu pankreatu v České republice 1977-2011

Graf 4: Věková struktura pacientů s karcinomem pankreatu v České republice

Obr. 1: Sonografický obraz adenokarcinomu hlavy pankreatu

Obr. 2: CT nález tumoru hlavy pankreatu s mnohočetnými MTS v játrech a LU

Obr. 3: PET/CT nález tumoru pankreatu

Obr. 4: Odběr vzorku peritoneální laváže

Tab. 1: Charakteristika pacientů (ND nestanoveno)

Tab. 2: Cut-off hodnoty exprese CEA, EGFR a hTERT v peritoneální laváži.

Obr. 5: Absolutní exprese CEA (kopie mRNA genu/ μg RNA) ve skupině kontrol a pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu.

Obr. 6: Absolutní exprese EGFR (kopie mRNA genu/ μg RNA) ve skupině kontrol a pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu.

Obr. 7: Absolutní exprese hTERT (kopie mRNA genu/ μg RNA) ve skupině kontrol a pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu.

Obr. 8: Normalizovaná exprese EGFR (kopie mRNA genu/ kopie mRNA GAPDH) ve skupině kontrol a pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu.

Obr. 9: Normalizovaná exprese hTERT (kopie mRNA genu/ kopie mRNA GAPDH) ve skupině kontrol a pacientů s pokročilým adenokarcinomem pankreatu.