

Profilul citokinelor și moleculelor de adeziune în cancerul pancreatic

Autor: Milea Viorica Ghizela Iolana

Conducător științific: Prof. Dr. Victor Cristea



REZUMAT

Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”

2009

CUPRINS

Cuprins.....	2
Listă de abrevieri.....	3
Rezumat în limba română.....	6
Introducere.....	7
Partea generală.....	10
1. Epidemiologia cancerului pancreatic	11
2. Rolul factorilor genetici în dezvoltarea cancerului pancreatic	12
2.1. Oncogenele (proto-oncogenele).....	12
2.2. Anti-oncogenele (genele supresoare).....	14
2.2. Gene cu rol în repararea leziunilor ADN.....	15
3. Precursori ai cancerului pancreatic.....	15
4. Considerații clinice asupra cancerului pancreatic.....	20
5. Pancreatita cronică	21
6. Rolul inflamației cronice în cancerogeneză.....	22
7. Potențialul mutagenic al inflamației	25
8. Citokinele.....	30
9. Moleculele de adeziune celulară	36
10. Contribuția citokinelor și moleculelor de adeziune în oncogeneză	38
11. Apoptoza și supraviețuirea celulară	41
12. Evaziunea imună.....	43
13. Angiogeneza.....	45
14. Invazia locală și constituirea metastazelor.....	48
15. Chemokine produse de către tumori și celulele atrase	55
Partea specială.....	62
1. Scopul lucrării	63
2. Material și metode	64
3. Rezultatele obținute.....	67
4. Discuția rezultatelor.....	121
5. Concluzii.....	140
6. Referințe.....	143
Rezumat în limba engleză.....	176
Anexă - Articole publicate în reviste de specialitate ca prim autor	

CUVINTE CHEIE: cancer pancreatic, pancreatită cronică, citokine, molecule de adeziune, inflamație

INTRODUCERE

Ipoteza transformării inflamației cronice în cancer, o concepție ce datează încă din a doua jumătate a secolului XIX (Virchow 1863) și se bazează pe date epidemiologice, clinice și histologice, este susținută în prezent de noi date experimentale prin care s-a demonstrat că dezvoltarea cancerului poate fi un proces realizat de celulele inflamatoare, precum și de o diversitate de mediatori care includ citokine, chemokine și enzime care formează împreună un micromediu inflamator.

În mod clasic, se considera că reacția inflamatorie peritumorală reprezintă un răspuns imun al gazdei, similar cu cel față de o agresiune microbiană, răspuns care, dacă este suficient de puternic poate conduce la eradicarea unei tumori incipiente. În ultimul deceniu au apărut însă numeroase lucrări experimentale care demonstrează rolul dual al acestei reacții, importanța celulelor inflamatorii (leucocitelor, în special al macrofagelor, celulelor dendritice, mastocitelor, neutrofilelor și/sau limfocitelor) din infiltratul inflamator, al citokinelor și chemokinelor, în facilitarea dezvoltării cancerelor, în promovarea creșterii tumorilor, a invazivității și metastazării. Datele clinice demonstrează de asemenea că inflamația are un efect dual, pe de-o parte promovează creșterea neoplaziilor, inhibiția ei reducând chiar riscul la cancer, dar pe de altă parte și că inducerea unui răspuns antitumoral se bazează pe o reacție inflamatorie puternică activată prin administrarea terapeutică de citokine și alți agenți proinflamatori.

Scopul lucrării de față a fost testarea reflectării în sângele circulant a inflamației periferice peritumorale în cancerule pancreatice, domeniu prea puțin investigat până în prezent. Alegerea acestei teme a fost motivată atât de particularitățile evolutive ale bolii – agresivitate crescută, rezistență terapeutică și incidență crescândă a numărului de cazuri – cât și de posibila relație a procesului inflamator cu oncogeneza și progresia tumorală, fenomene din ce în ce mai bine argumentate în ultimii ani. În plus, ea permite compararea cu o afecțiune inflamatorie clasică, respectiv pancreatita acută și cronică.

În partea generală a tezei sunt prezentate datele epidemiologice privind adenocarcinomul pancreatic, unul din cele mai letale cancere ale tractului gastrointestinal, reprezentând a cincea cauză de deces oncologic în lumea occidentală, cu o rată de supraviețuire la 5 ani de doar 4%. Studii retrospective au evidențiat o creștere globală a ratei mortalității prin cancer pancreatic, reflectând, de fapt, o creștere a incidenței tumorilor pancreatice. Această tendință de creștere a incidenței, alături de prognosticul infaust, susțin necesitatea aprofundării mecanismelor care stau nu numai la baza carcinogenezei pancreatice, ci și a evoluției acesteia, în scopul găsirii unor terapii eficiente.

Sunt trecuți în revistă factorii genetici implicați în generarea cancerului pancreatic: oncogenele (mutațiile *K-RAS*, genele *BRAF*, *PIK3CA*, *AKT2*, *RAL A* și *RAL B*, *Hedgehog*, *Notch* etc.) și mutațiile antioncogenelelor (*p16INK4A/CDKN2A*, *MTAP*, *p53*, *DPC4*, *MKK4* etc), precum și leziunile precanceroase (neoplaziile intraepiteliale, mucinoase chistice și intraductale papilare mucinoase).

Cea mai amplă prezentare din partea generală este dedicată rolului inflamațiilor cronice în geneza cancerelor în general, și a celui pancreatic în special. Studiile recente au evidențiat o creștere a incidenței cancerului pancreatic în rândul pacienților cu pancreatită cronică, față de populația generală. Rata standardizată a incidenței, în diferite studii, are valori între 3,8 și 18,5, iar creșterea riscului relativ poate ajunge

până la de 16 ori față de persoanele fără pancreatită cronică. Inflamația cronică, indiferent de etiologie, generează distrucție tisulară, *turn-over* celular crescut, remodelare tisulară și angiogeneză. În acest context pot să apară metaplazii, crește riscul mutațiilor genice și al transformării neoplazice. Inițierea unui carcinom pe fond inflamator este rezultatul interacțiunilor complexe dintre actorii reacției inflamatorii benigne, dar care, prin stimulare cronică, ajung să se angajeze într-un proces neoplazic. Ne referim la celulele epiteliale normale ale organismului, fibroblaști stromali, celule inflamatorii, celule endoteliale, componente ale matricei extracelulare și activatori moleculari ai căilor de semnalizare – factori de creștere, citokine și molecule de adeziune.

Procesul invers, de inducere a inflamației la nivel tumoral, se constată în toate tumorile pancreatice cu determinism genetic. Tumora inițiată prin mutații la nivel ADN își va crea un micromediu favorabil prin producția proprie de chemokine. Chemokinele tumorale vor atrage celule ale sistemului imun, manipulându-le ulterior în sensul unor comportamente pro-tumorale (ilustrativ în acest sens este cazul macrofagelor asociate tumorilor, TAM). De asemenea, celulele maligne pot modifica profilul moleculelor de adeziune și comportamentul celulelor locale (de exemplu celula stelată pancreatică), în scopul remodelării matricei extracelulare pentru favorizarea migrării polimorfonuclearelor, a macrofagelor, celulelor dendritice, mastocitelor și a limfocitelor T. În partea generală sunt prezentate pe larg rolurile celulelor inflamatorii asociate tumorilor (TAM, neutrofile, mastocite, limfocite T), al moleculelor de adeziune celulară (familiile: caderinelor, integrinelor, selectinelor, moleculelor mucin-like și superfamilia imunoglobulinelor), al reglatorilor moleculari: citokine (TNF- α , IL-6), chemokine (IL-8/CXCL8, MIP3- α /CCL20), precum și implicarea acestora în oncogeneză, apoptoză, angiogeneză, evaziune imună, invazie locală și metastazare.

În lucrare am ales testarea unor citokine și chemokine proinflamatorii, TNF- α , IL-6, IL-8, MIP3- α , cu impact major atât în patogeneza unor afecțiuni inflamatorii acute și cronice sau boli autoimune, cât și în bolile neoplazice. Deoarece cercetările din ultimii ani au demonstrat importanța creșterii nivelului seric al unor molecule de adeziune celulară (CAM) solubile: sICAM-1, sVCAM-1 în identificarea reacțiilor inflamatorii, am analizat comparativ atât aceste molecule cât și sE-caderina, știut fiind faptul că aceasta din urmă scade semnificativ de pe membranele celulelor maligne.

Deoarece atât tumorile pancreatice cât și pancreatitele se acompaniază frecvent de alterarea unor teste biochimice, am vrut să vedem dacă există sau nu corelații între parametri imuni testați și cei biochimici, aspect încă neîntâlnit în literatura de specialitate.

MATERIAL ȘI METODE

Au fost testați 95 de subiecți împărțiți în trei loturi: 37 cu neoplazii pancreatice, 38 cu pancreatită și 20 de martori sănătoși. Toate testările s-au făcut în duplicat pe serul provenit din sângele recoltat dimineața a jeun.

Testările imunologice au cuprins: antigenul CA 19-9, ca marker al malignităților pancreatice, moleculele de adeziune celulară solubile: sE-caderina, sICAM-1, sVCAM-1, citokinele proinflamatoare TNF- α , IL-6, chemokinele proinflamatoare IL-8 și MIP-3 α , precum și proteina C reactivă (CRP).

Pentru a evidenția diferențele dintre cele trei loturi investigate au fost investigați inițial parametri standard: sex, vârstă, viteza de sedimentare a hematiilor (VSH) la o oră și la 2 ore, hematocrit (Htc), numărul de hematii (H), de leucocite (L) și trombocite (T), concomitent cu unele teste biochimice standard: amilazele serice și

urinare, valorile serice ale transaminazelor ASAT și ALAT, gamaglutamil transpeptidaza (GGT), glicemia, ureea, creatinina, colesterolul, trigliceridele, bilirubina totală și cea directă. Toate rezultatele au fost prelucrate statistic și s-a calculat: media, eroarea mediei (EM), deviația standard (SD), semnificația statistică a diferențelor prin testul t Student, coeficienții de corelație (r) Pearson și Spearman și dreptele de regresie.

REZULTATE ȘI DISCUȚIA LOR

Studierea comparativă a unor parametri imuni, biochimici și hematologici la cele trei loturi de subiecți a condus la obținerea unor rezultate deosebit de interesante.

- La testarea formelor serice ale celor trei molecule de adeziune celulară (CAM) am constatat o creștere semnificativă, comparativ cu martorii, a formelor solubile ale E-caderinei, ICAM-1 și VCAM-1. (Tabelul I).

Tabelul I. Valorile medii, în ng/ml, ± eroarea statistică a mediei (EM) și deviația standard (SD) ale CAM la cele trei loturi de subiecți.

Molecula	sE-caderina	sICAM-1	sVCAM-1
Martori 20 subiecți			
Media±EM	2,94±1,223	10,75±1,536	34,80±6,493
SD	5,470	6,869	29,038
Limite	0,10-17,3	1,50-30,50	5,21-96,14
Pancreatite 38 pacienți			
Media±EM	26,62±4,065**	27,07±2,895**	418,08±35,322**
SD	25,061	17,844	217,739
Limite	0,58-86,24	2,36-82,30	0,36-751,38
Tumori pancreatice 37 pacienți			
Media±EM	16,10±2,991**§	38,74±4,025**	583,03±35,836**§§
SD	18,196	24,484	217,982
Limite	0,10-90,80	4,42-115,41	116,70-946,80

Diferența față de martori: semnificația $p < 0,05$; *. Diferența semnificativă $p < 0,01$ **
Diferența față de pancreatită, semnificația $p < 0,05$ §; semnificația $p < 0,01$ §§

- La testarea E-caderinei serice valorile medii calculate la pacienții cu tumori pancreatice au fost semnificativ mai mari decât cele ale martorilor ($p < 0,0002$), fapt în concordanță cu cercetările imuno-histochimice care au demonstrat scăderea formei membranale a acestei molecule de adeziune celulară în cancere. În plus, am constatat că nivelele serice ale sE-caderinei la pacienții cu pancreatită au fost semnificativ superioare nu numai comparativ cu martorii ($p < 0,0001$), ci și cu pacienții canceroși ($p < 0,05$) (Tabelul I). Nivelele ridicate ale sE-caderinei, nu numai în tumorile pancreatice ci și în pancreatite, pledează pentru detașarea acestei molecule de adeziune în urma acțiunii unor proteaze din micromediul inflamator (probabil datorită supraexprimării metaloproteinazelor matriceale și/sau MMP-2 și MMP-9 tumorale) și nu printr-o sinteză trunchiată a E-caderinei din celulele tumorale, ca urmare a unui splicing alternativ al mRNA.

- Creșterea semnificativă ($p < 0,0001$) a formei solubile a ICAM-1/CD54 în malignitățile pancreatice, precum și în pancreatite, comparativ cu lotul martor, sunt un argument în plus pentru acțiunea crescută a unor proteaze extracelulare, a scăderii antiproteazelor și a transformării acestor zimogene în forme active ca urmare a mediului inflamator.

- Valorile medii cele mai ridicate ale sVCAM-1/CD1106 au fost obținute la pacienții cu tumori pancreatice, semnificativ superioare celor din pancreatite ($p < 0,01$) și mai ales în comparație cu martorii ($p < 0,01$) (Tabelul I). Întrucât la ambele loturi cu

afecțiuni pancreatice valorile medii au același ordin de mărime (de peste 10 ori mai mari decât la martori), datele obținute pledează de asemenea pentru o eliberare a sVCAM-1 de pe suprafața celulelor tot printr-o clivare proteolitică realizată de enzimele micromediului înconjurător.

Tabelul II. Valorile medii \pm EM în pg/ml, SD și valorile limită ale citokinelor și chemokinelor proinflamatoare: TNF- α , IL-6, IL-8 și MIP-3 α

	TNF-α	IL-6	IL-8	MIP-3 α
Martori 20 subiecți				
Media\pmEM	30,29 \pm 2,869	3,493 \pm 0,633	3,296 \pm 0,602	29,95 \pm 3,942
SD	12,829	2,830	2,694	17,630
Limite	17,18-61,18	0,45-9,06	0,56-9,99	7,40-62,40
Pancreatite 38 pacienți				
Media\pmEM	429,49 \pm 57,024**	20,186 \pm 2,476**	7,765 \pm 2,036*	157,51 \pm 19,099**
SD	351,522	15,260	12,549	117,734
Limite	40,12-1203,6	0,00-59,64	0,02-60,62	4,28-501,30
Tumori pancreatice 37 pacienți				
Media\pmEM	270,54 \pm 45,230**§	19,480 \pm 4,047**	99,571 \pm 54,073*	259,692 \pm 20,504**
SD	275,125	24,616	328,912	124,721
Limite	10,19-978,60	0,10-105,71	6,00-1997,80	31,30-490,82

Diferența față de martori: semnificația $p < 0,05$ *. Diferența semnificativă $p < 0,01$ **

Diferența față de pancreatită, semnificația $p < 0,05$ §; semnificația $p < 0,01$ §§

La testarea citokinelor proinflamatoare am constatat următoarele aspecte:

- Creșterea semnificativă a sTNF- α în pancreatite ($p < 0,01$) în comparație cu tumorile pancreatice ($p < 0,05$) și cu martorii sănătoși ($p < 0,01$) (Tabelul II). Datele obținute sunt în concordanță cu datele din literatură privind amplificarea producției de citokine proinflamatoare, TNF- α , IL-6 și IL-8, în pancreatite, mai ales în cele acute. De asemenea, le confirmă pe cele recente ale altor autori care demonstrează creșterea nivelelor serice ale citokinelor proinflamatoare, TNF- α , IL-6, IL-2, leptina și CRP, în special în stadiile avansate ale bolii canceroase.

- Nivele serice semnificativ superioare am obținut și în cazul altei citokine proinflamatoare, IL-6, atât în pancreatite ($p < 0,001$), cât și în cancerul pancreatic ($p < 0,001$) comparativ cu martorii (Tabelul II).

Rezultatele obținute în cazul chemokinelor sunt ușor diferite:

- Cu toate că nivelele medii serice ale IL-8/CXCL8 din pancreatită au fost mai mult decât duble față de cele ale martorilor, diferențele au atins doar limita semnificației statistice ($p < 0,05$), la fel cu cele din tumorile pancreatice a căror dispersie extremă a valorilor a făcut ca semnificația să fie de asemenea la limită ($p < 0,05$) (Tabelul II). În plus, diferența dintre valorile medii din pancreatite și tumori deși pare mare, totuși calculul statistic a demonstrat că nu este semnificativă ($p > 0,05$).

- Diferențele dintre valorile medii ale altei chemokine, mult mai puțin investigată în cancer, MIP-3 α /CCL20 obținute la pacienții cu pancreatite și neoplazii pancreatice diferă înalt semnificativ de cele ale martorilor sănătoși ($p < 0,0001$). Prezența unor nivele ridicate a chemokinelor în serul pacienților investigați de noi confirmă implicarea chemokinelor în patogeneză cancerelor în general și al cancerului pancreatic în particular.

- Toate aceste rezultate demonstrează prezența unei reacții inflamatorii la nivelul cancerelor pancreatice.

La pacienții cu pancreatită am găsit un nivel mediu al markerului CA19-9 (cel mai utilizat în cancerul pancreatic) de 5,76 \pm 0,736U/ml, semnificativ inferior ($p < 0,001$) celui din cancerul pancreatic, 390,59 \pm 137,285 U/ml, ceea ce confirmă valoarea lui în

diagnosticul diferențial, chiar dacă la unele cazuri de pancreatite valorile extreme se suprapun celor minime din cancerele pancreatice.

Testările corelațiilor între parametri imuni testați, precum și ale acestora cu cei biochimici ne-au furnizat rezultate neașteptate și deosebit de interesante, dintre care unele nu au fost încă raportate în literatură.

1. În cazul moleculelor de adeziune celulară am obținut, surprinzător, în tumorile pancreatice, corelații negative statistic semnificative ($p < 0,01$) ale sE-caderinei cu nivelul chemokinei MIP-3 α ($r = -0,391$; $p = 0,008$) și cu VSH ($r = -0,463$; $p = 0,007$) fenomen încă nesemnlat în literatură, precum și lipsa corelațiilor cu TNF α , citokină care prin inducerea producerii de metaloproteinaze matriceale (MMP) ar putea favoriza detașarea de pe celula canceroasă a moleculei de adeziune E-caderina.

2. La pacienții cu pancreatită am constatat existența unei corelații negative înalt semnificative ($p < 0,01$) surprinzătoare cu nivelul colesterolului seric ($r = -0,462$; $p = 0,007$) (fig.1). Deoarece în bibliografia consultată nu am găsit date, nici clinice și nici experimentale, în acest domeniu, este greu de explicat interrelația dintre acești doi parametri, de ce scăderea colesterolului seric se asociază cu creșterea sE-caderinei, cu atât mai mult cu cât ea nu mai apare la testările făcute la pacienții cu tumori pancreatice. Mecanismul prin care se produc interrelațiile respective ale sE-caderinei deschid perspectivele unor investigații ulterioare.

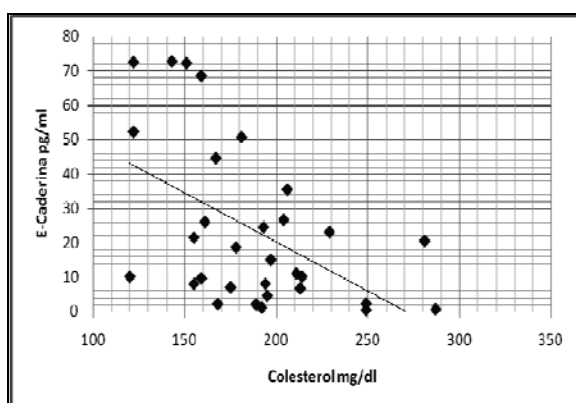


Fig.1. Corelația negativă și dreapta de regresie ale sE-caderinei în funcție de colesterol la pacienții cu pancreatită ($r = -0,462$; $p = 0,007$).

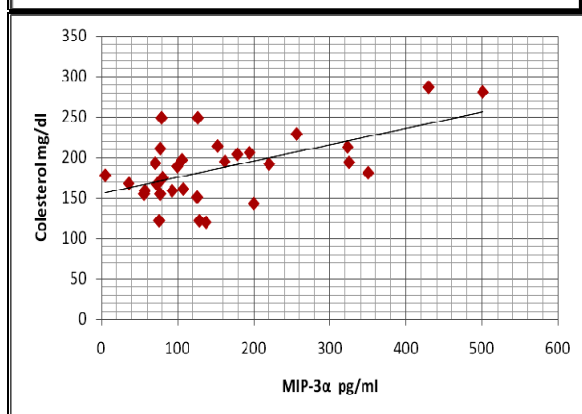


Fig.2. Corelația și dreapta de regresie ale colesterolului seric în funcție de MIP-3 α la pacienții cu pancreatită ($r = 0,437$; $p = 0,011$).

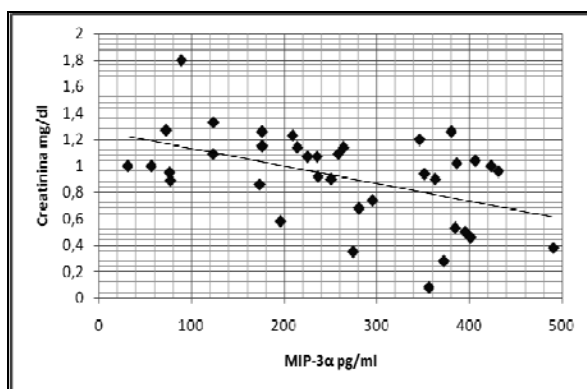


Fig.3. Corelația și dreapta de regresie ale creatininei serice în funcție de MIP-3 α la pacienții cu tumori pancreatice ($r=0,494$; $p=0,002$)

3. Spre deosebire de loturile pacienților cu afecțiuni pancreatice, martorii au prezentat interrelații pozitive ale sE-caderinei cu IL-6 ($r=0,422$; $p<0,05$). În schimb, la cei cu tumori au fost negative cu MIP-3 α ($r=-0,416$; $p<0,05$).

4. Molecula sICAM-1 s-a corelat înalt semnificativ cu MIP-3 α la martori ($r=0,636$; $p<0,001$), corelație pe care nu am mai găsit-o la pacienții cu afecțiuni pancreatice.

5. Datele obținute au demonstrat existența unor corelații înalt semnificative ale TNF- α cu numărul de leucocite din sânge ($r=0,453$; $p=0,005$), cu ASAT ($r=0,463$; $p=0,004$), ALAT ($r=0,387$, $p=0,018$) și fosfataza alcalină ($r=0,399$; $p=0,029$) în tumorile pancreatice, iar în pancreatite cu bilirubina totală ($r=0,532$; $p=0,001$) și directă ($r=0,523$; $p=0,012$). La martori însă sunt prezente corelații semnificative numai cu IL-6 ($r=0,402$; $p=0,04$), altă citokină proinflamatoare, ceea ce este în concordanță cu datele experimentale.

6. În cazul IL-6, dacă la martori am constatat existența interrelațiilor semnificative directe cu sE-caderina ($r=0,422$; $p=0,032$) și negative cu IL-8 ($r=-0,568$; $p=0,005$), în tumorile pancreatice am evidențiat, pe lângă aceeași corelație negativă cu IL-8 ($r=-0,307$, $p<0,04$), una pozitivă cu CA19-9 ($r=0,310$; $p<0,04$), similar cu cea constatată și în pancreatite ($r=0,439$; $p<0,08$).

7. Dacă interrelația dintre IL-6 și proteina C reactivă (CRP) era de așteptat dat fiind faptul că IL-6 induce sinteza hepatică a CRP, faptul că am găsit o corelație inversă în pancreatite este cu totul contrar așteptărilor ($r=-0,439$; $p<0,008$). În plus, la acești bolnavi am obținut corelații statistic semnificative de tip invers cu GGT ($r=-0,559$; $p=0,001$) și cu fosfataza alcalină ($r=-0,358$; $p=0,041$), spre deosebire de tumorile pancreatice unde nu am găsit corelații statistic semnificative cu niciunul din parametri biochimici investigați. Semnificația comportamentului diferit al IL-6 din ser în cele două afecțiuni merită investigații ulterioare.

8. În cancerle pancreatice și la martori singura corelație statistic semnificativă a chemokinei IL-8/CXCL8 a fost una negativă cu IL-6 ($r=-0,307$; $p<0,04$, respectiv $r=-0,568$; $p=0,005$), spre deosebire de pacienții cu pancreatită unde corelațiile sunt cu ambele citokine proinflamatoare: IL-6 ($r=0,390$; $p<0,008$) și TNF- α ($r=0,353$; $p<0,02$).

9. Prelucrarea statistică a evidențiat la martorii sănătoși prezența unor corelații pozitive ale MIP-3 α cu sICAM-1 ($r=0,636$; $p<0,001$) și negative cu sE-caderina ($r=-0,416$; $p=0,034$), spre deosebire de pacienții cu tumori pancreatice unde este prezentă doar corelația cu sE-caderina dar pozitivă ($r=0,391$; $p<0,008$) și de cei cu pancreatită unde există cea cu sICAM-1 ($r=0,282$; $p<0,05$).

10. Cu totul neașteptate și nesemnificate în literatură au fost rezultatele prelucrărilor statistice ale corelațiilor cu testările biochimice. În cazul pancreatitelor, am găsit corelații semnificative ale IL-8 cu fosfataza alcalină ($r=0,394$; $p=0,023$) și creșterea proporțională a MIP-3 α cu colesterolul ($r=0,437$; $p=0,011$) (Fig.2) și cu ureea

serică ($r=0,393$; $p=0,016$). La pacienții cu tumori pancreatice nu mai apare o interdependență între IL-8 și fosfataza alcalină, iar MIP-3 α se corelează semnificativ cu VSH ($r=0,463$; $p=0,02$) și înalt semnificativ dar negativ cu creatinina ($r=-0,494$, $p=0,002$). (Fig.3).

CONCLUZII

- Analiza formelor solubile ale moleculelor de adeziune: sE-caderina, sICAM-1 și sVCAM-1 demonstrează creșterea semnificativă a acestora în serul pacienților cu tumori pancreatice, comparativ cu martorii sănătoși.

- Faptul că am constatat creșteri similare și la pacienții cu pancreatite, pledează pentru generarea lor prin mecanisme proteolitice, probabil extracelulare (proteaze ale matricei sau provenite din celulele infiltratului inflamator), nu printr-o sinteză a formelor trunchiate ale moleculelor datorate unui splicing alternativ al mRNA.

- Nivelele ridicate ale citokinelor proinflamatoare – TNF- α și IL-6 – în sângele periferic atât al pacienților cu tumori cât și al celor cu pancreatită sunt un argument în plus în favoarea unei reacții inflamatorii puternice în cancerul pancreatic.

- La originea concentrațiilor deosebit de mari ale chemokinelor IL-8/CXCL8 și MIP-3 α /CCL20 la pacienții cu neoplazii maligne ale pancreasului, superioare celor din pancreatite, par să fie nu numai cele produse de celulele infiltratului inflamator ci și de către însăși celulele tumorale.

- Antigenul CA19-9 s-a dovedit a fi un marker util mai ales la cazurile de cancer în stadii avansate.

- Studiarea interrelațiilor dintre parametri imuni cercetați a furnizat unele rezultate interesante, corelațiile obținute în cancerul pancreatic fiind adesea diferite de cele din pancreatite și uneori mai apropiate de cele constatate la martori.

- Rezultate cu totul neașteptate, încă nemenționate în literatură am obținut prin analiza corelațiilor dintre parametri imuni investigați și cei biochimici și/sau hematologici. De exemplu, în cancerul pancreatic, existența unor corelații înalt semnificative ale: IL-8 cu fosfataza alcalină; MIP-3 α cu VSH, corelațiile negative dintre sE-caderină și VSH, MIP-3 α și creatinina; corelațiile TNF- α cu numărul de leucocite din sânge, cu ASAT, ALAT și fosfataza alcalină.

- În pancreatite de asemenea sunt surprinzătoare corelațiile: sE-caderinei cu colesterolul seric, ale IL-8 cu fosfataza alcalină și ale TNF- α cu bilirubina totală și directă.

Constatarea acestor interdependențe între anumiți parametri imuni și biochimici, interdependență nesemnificativă încă în literatură, deschide noi perspective de investigații în viitor.

CURRICULUM VITAE

I. DATE PERSONALE

Nume: Milea (Kuttlik)

Prenume: Viorica Ghizela Iolana

Domiciliu: Bistrița, Aleea Merilor, Bl.1, Sc.C Et.3, Ap.35, Jud. Bistrița-Năsăud

Data nașterii: 18 decembrie 1948

Locul nașterii: Aita Mare, Jud. Covasna

Locul de muncă: Spitalul Județean Bistrița, Secția Medicină Internă I

Funcția actuală: Medic primar specialitatea Medicină internă, competență în ecografie generală

II. STUDII ȘI ACTIVITATE PROFESIONALĂ

- Liceul Teoretic Nr. 2 din Sfântu Gheorghe, Jud. Covasna, secția umană, absolvit în 1966
- Facultatea de Medicină Generală absolvită la UMF Tg. Mureș în 1972
- Intern clinic la Spitalul Clinic Teritorial Nr. 1 Tg. Mureș: 1972 - 1974
- Medic secundar Interne la Spitalul Clinic Teritorial Nr. 1 Tg. Mureș: 1974 - 1977
- Medic specialist Interne din 1977, în urma examenului național de specialitate, București
- Medic principal specialitatea Medicină internă, la Spitalul Județean Bistrița: 1977 - 1992
- Medic primar Interne la Spitalul Județean Bistrița: 1992 - prezent
- Competență în ecografie generală pe baza examenului susținut în 30 aprilie 1997 la Institutul de Pregătire Postuniversitară a Medicilor și Farmaciștilor
- Doctorand al Universității de Medicină și Farmacie Cluj Napoca, Catedra de Imunologie Clinică, din data de 1 noiembrie 2006.

III. ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ

Autor sau co-autor la următoarele manifestări/lucrări științifice:

- A III-a Conferință Națională de Patologie Infecțioasă, București 27-28 septembrie 1973 cu lucrările:
 - Marer Eva, Makai Margareta, Mathe Ildiko, L Kasza, A Palencsar, P Szekely, D Szilagyi, Viorica Kuttlik. Particularitățile clinico-biologice ale hepatitei virale tip "A" și "B". Revista Medicală 1973;4:315-319.
 - L Kasza, Makai Margareta, Marer Eva, Mathe Ildiko, Viorica Kuttlik. Hepatita virală acută de tip B prin infecție neparenterală: date despre frecvența ei prin testarea antigenului Australia". Revista Medicală 1973;4:246.

- P Szekely, L Kasza, A Palencsar, D Szilagy, Marer Eva, Viorica Kuttlik. Perspectivele tratamentului conservativ în hepatita virală malignă. Revista Medicală 1973;4:305.
- Kovendi Erzsebet, L Kasza, Makai Margareta, Mathe Ildiko, P Szekely, Marer Eva, A Palencsar, D Szilagy, Viorica Kuttlik. Aspecte din profilaxia prospectivă in hepatita virală: experiența de zece ani a unui dispensar posthepatitic. Revista Medicală 1973;4:365.
- L Kelemen, Szentkiralyi Eva, Rodica Pascu, Viorica Kuttlik. Unele date privind clinica parotiditei epidemice. Viața Medicală 1973;24:1111-1117.
- Colocviul al II-lea de Gastroenterologie Bistrița, octombrie 1978:
 - Buse A, Bulbuc T, Milea Viorica. Morbiditatea prin hepatopatii cronice în Spitalul Județean Bistrița în perioada 1974-1977.
- Colocviul al IV-lea de Gastroenterologie Bistrița, 17-18 octombrie 1980:
 - Belascu M, Lezeu R, Bulbuc T, Viorica Milea. Factori etiopatogenici implicați in hepatitele cronic.
- Al V-lea Congres Național de gastroenterologie 21-23 mai 1986-București:
 - Viorica Milea, Ilies Rodica, Lezeu R, Mitre R. Studiu statistic asupra stadiului de depistare a cancerului gastric la bolnavii internați în secția interne la Spitalul Județean Bistrița in perioada 1980-1985 (Cartea de rezumate pg.116).
- Colocviul al VIII-lea de Gastroenterologie Bistrița, 7-8 octombrie 1988:
 - Lezeu R, Buse A Viorica Milea . Hemoragii digestive inferioare de cauze medicale-studiu retrospectiv pe zece ani.
- Colocviul al IX-lea de Gastroenterologie Bistrița, octombrie 1989:
 - Anton C, Ilies R, Neagos F, Milea Viorica, Bulbuc T, Neamtiu V, Lezeu R. Rectocolita hemoragică în Spitalul Județean Bistrița. Studiul retrospectiv pe 10 ani (1979-1988).
- Viorica Milea, Miron N, Cristea V. Relația dintre pancreatita cronică și cancerul pancreatic – rolul inflamației în oncogeneză. Clujul Medical 2007;4:820-826.
- Miron N, Al-Najdawi M, Patiu I, Viorica Milea, Cristea V. Apariția anticorpilor antifosfolipidici la pacienții cu hepatită cronică virală C. Clujul Medical 2008;2:199-203.
- Viorica Milea, Miron N, Miron M, Cristea V. Mediatori moleculari ai oncogenezei în cancerul pancreatic. Clujul Medical 2009;1:86-91.
- Participare la realizarea Proiectului European de Cercetare a Icterului-ICTEC sub egida Comunității Europene, sub îndrumarea Prof. S.M. Lavelle de la Institutul de Cercetări Clinice, Galway, Irlanda - din data de 24 aprilie 1996. Pentru acest proiect am prelucrat 50 de cazuri de icter de la Spitalul Județean Bistrița, utilizând procedurile complexe indicate de coordonatorii proiectului.
- Participări la Congresele, Conferințele și cursurile organizate de Societatea Româna de Ultrasonografie și European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology, fiind membră a acestor societăți.

IV. CURSURI POSTUNIVERSITARE

- Curs de perfecționare la Spitalul Clinic Fundeni-București 1-30 iunie 1983: “Actualități în gastroenterologie”
- Curs de perfecționare la UMF Cluj-Napocai 15 aprilie-31 mai 1986: “Actualități în medicina internă”
- Curs de perfecționare la UMF Tg. Mureș 1 martie-15 aprilie 1988: “Actualități și urgențe în medicină internă și cardiologie”
- Stagiu practic la Clinica Medicală a Spitalului Cantonal din Münstertingen, Elveția 22 octombrie-29 noiembrie 1991
- Curs de ecografie generală la UMF Tg. Mureș 1 aprilie-15 mai 1996
- Curs de ecografie specială la Spitalul Clinic de Adulți Cluj-Napoca 15 ianuarie - 28 februarie 1997
- Cursul precongres “Diagnosticul ecografic al tumorilor abdominale și utero-ovariene” cu ocazia primului Congres de Ultrasonografie in Medicină-București 2000
- Cursul precongres “Euroson Shool “26-27 mai 2001-Timișoara
- Cursul precongres “EuroShool Vascular Ultrasonography” 25-26 mai 2002-Sibiu
- Cursul precongres “Ecografia în urgențele abdominale” 25-26 mai 2004-Arad
- Cursul precongres “Euroson Spring Course-Ultrasonography of Digestive Tumours” Cluj-Napoca 26-27 mai 2005
- Cursul precongres “Ultrasonography in emergencies” 25-26 mai 2006-Oradea

The profile of cytokines and cell adhesion molecules in pancreatic cancer

Author: Milea Viorica Ghizela Iolana

Supervisor: Prof. Dr. Victor Cristea



SUMMARY

The University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hațieganu”

2009

CONTENTS

Contents.....	2
Abbreviation list.....	3
Romanian Summary ...	6
Introduction.....	7
State-of-the-art.....	10
1. Epidemiology of pancreatic cancer.....	11
2. The role of genetic factors in the development of pancreatic cancer.....	12
2.1. Oncogenes (proto-oncogenes).....	12
2.2. Anti-oncogenes (supressor genes).....	14
2.2. Genes involved in DNA lesions repair.....	15
3. Precursors of pancreatic cancer.....	15
4. Clinical considerations concerning pancreatic cancer.....	20
5. Chronic pancreatitis	21
6. The role of chronic inflammation in carcinogenesis.....	22
7. The mutagenic potential of inflammation.....	25
8. Cytokines.....	30
9. Cell adhesion molecules.....	36
10. The contribution of cytokines and cell adhesion molecules in oncogenesis.....	38
11. Apoptosis and cell survival.....	41
12. Immune evasion.....	43
13. Angiogenesis.....	45
14. Local invasion and metastasation.....	48
15. Tumor-produced chemokines and the recruited cells.....	55
Personal contribution.....	62
1. Purpose.....	63
2. Matherial and methods.....	64
3. Results.....	67
4. Discussion.....	121
5. Conclusions.....	140
6. References.....	143
English summary.....	176
Appendix – Articles published in specialty reviews as first author	

KEY WORDS: pancreatic cancer, chronic pancreatitis, cytokines, cell adhesion molecules, inflammation

INTRODUCTION

The hypothesis of chronic inflammation evolving into cancer, dating from the second half of the XIX-th century (Virchow 1863) and relying upon epidemiological, clinical and histological data, is nowadays sustained by new experimental data, which demonstrate that the development of cancers can be a process generated by inflammatory cells, as well as by a diversity of mediators including cytokines, chemokines and enzymes, all of which form together a inflammatory microenvironment.

Classically, it was considered that the peritumoral inflammatory reaction represented a response mounted by the host organism, similar to that against of a microbial aggression, response which, if strong enough, could eradicate an incipient tumour. During the past decade, there has been a considerable number of experimental studies which demonstrated the dual role of this reaction, the importance of the inflammatory cells (leukocytes, especially macrophages, dendritic cells, mast cells, neutrophils and/or lymphocytes) in the inflammatory infiltrates, of cytokines and chemokines, in promoting cancer development: tumour growth, invasiveness and metastases. Clinical data also demonstrate that inflammation has a dual effect, on one hand favouring neoplastic growth (inhibiting the inflammatory reaction reduces cancer risk), but on the other hand, a strong inflammatory reaction activated by the therapeutical administration of cytokines and other proinflammatory agents, will induce an anti-tumour response.

The purpose of the present paper was to test the seric reflection of the peritumoral inflammation in pancreatic cancers, a less investigated domain by now. The choice of this theme was motivated not only by the peculiarities of this disease – increased aggressiveness, resistance to current therapies, and rising population incidence – but also by the possible relationship between the inflammatory process with oncogenesis and tumour progression, phenomena with a better argumentation during the past years. Besides, chronic and acute pancreatitis represent a comparative model for this study.

In the general part of the thesis, we are being presented the epidemiological data concerning the pancreatic adenocarcinoma, one of the most lethal gastrointestinal tract cancers, representing the fifth death cause between other cancers in western countries, with a 5 year survival rate of only 4%. Retrospective studies have revealed a global increase of the pancreatic cancer mortality rate, actually reflecting the increase of pancreas tumours incidence. This increasing incidence trend, together with the unfavourable prognosis of the disease, sustain the need to a better understanding of the mechanisms underlying pancreatic carcinogenesis, with the aim of discovering efficient therapies.

We have reviewed the genetic factors involved in the aetiology of pancreatic cancer: oncogenes (*K-RAS* mutations, the genes *BRAF*, *PIK3CA*, *AKT2*, *RAL A* and *RAL B*, *Hedgehog*, *Notch* etc.) and anti-oncogenes mutations (*p16INK4A/CDKN2A*, *MTAP*, *p53*, *DPC4*, *MKK4* etc), as well as pre-neoplastic lesions (intraepithelial neoplasia, mucinous cystic neoplasm and intraductal papillary mucinous neoplasm).

The most elaborated presentation in the first part of the thesis is dedicated to the role of chronic inflammation in the development of cancers in general, and of pancreatic cancer, in particular. Recent studies have revealed an increase in the incidence of pancreatic cancer within patients diagnosed with chronic pancreatitis,

compared to the general population. The standardized incidence ratio, in different studies, varies between 3,8 and 18,5, and the associated relative risk can reach the value of 16 (compared to persons without chronic pancreatitis). Regardless of aetiology, chronic inflammation generates tissue destruction, increased cellular turnover, tissue remodelling and angiogenesis. In this context, the risk of genetic mutations is higher, with generation of metaplasia and neoplasia. The initiation of a carcinoma on an inflammatory background is the result of the complex interaction between the protagonists of the benign inflammatory reaction, which can, as a result of chronic stimulation, initiate a neoplastic process. We refer to normal epithelial cells, stromal fibroblasts, inflammatory cells, endothelial cells, components of the extracellular matrix and molecular activators of the signalling pathways – growth factors, cytokines and adhesion molecules.

The reversed process, of inducing inflammation in the tumour, can be demonstrated in all pancreatic tumours with genetic aetiology. The tumour, initiated by DNA mutations, will create itself a favourable milieu, through its own production of chemokines. Tumour-produced chemokines will attract immune cells, manipulating them in the direction of pro-tumour behaviour (an illustrative example is that of tumour associated macrophages, TAM). Also, malignant cells can alter the profile of adhesion molecules, as well as the behaviour of local cells (for instance, the pancreatic stellate cell), with the aim of remodelling the extracellular matrix in favour of leukocyte migration (neutrophils, macrophages, dendritic cells, mast cells, T cells). The “general part” also presents the roles of tumour-associated inflammatory cells (TAM, neutrophils, mast cells, T cells), of cell adhesion molecules (the families: cadherins, integrins, selectins, mucin-like molecules and the immunoglobulin super family), of molecular regulators: cytokines (TNF- α , IL-6), chemokines (IL-8/CXCL8, MIP3- α /CCL20), as well as their involvement in oncogenesis, apoptosis, angiogenesis, immune evasion, local invasion and metastasation.

In our paper, we chose to test a couple of inflammatory cytokines and chemokines, TNF- α , IL-6, IL-8, MIP3- α , with major impact in the pathogenesis of acute or chronic inflammatory diseases, autoimmune disorders and malignancies. Because recent researches have proved the importance of increased seric levels of soluble cell adhesion molecules (CAM): sICAM-1, sVCAM-1 in the identification of inflammatory reactions, we also analyzed these molecule, and sE-cadherin, given the fact that its expression diminishes significantly on the membranes of malignant cells.

Because both pancreatic tumours and pancreatitis are frequently accompanied by the alteration of certain biochemical tests, we wanted to see if there are any correlations between the tested immune and biochemical parameters, an aspect yet unstudied in literature.

MATERIAL AND METHODS

We tested 95 subjects, divided in three groups: 37 with pancreatic neoplasias, 38 with pancreatitis and 20 healthy controls. All analyses were performed in duplicate on serum from blood samples prelevated a jeun.

The immunology tests involved: CA 19-9 antigen, as a marker for pancreatic malignancies, soluble cell adhesion molecules: sE-cadherin, sICAM-1, sVCAM-1, proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6, proinflammatory chemokines IL-8 and MIP-3 α , and C reactive protein (CRP).

In order to reveal the differences between the three study groups, we investigated standard parameters such as: sex, age, erythrocyte sedimentation rate

(ESR) measured at 1 and 2 hours respectively, hematocrit (Htc), erythrocyte count (He), leukocyte count (L) and platelets (Plt), concomitantly with standard biochemical tests: serum and urine amylase, hepatic enzymes AST and ALT, gammaglutamyl transpeptidase (GGT), glycaemia, blood urea, serum chreatinine, cholesterol, triglycerides, total and direct bilirubin. All results were subjected to statistical analysis, with the determination of the: mean value, standard error of the mean (EM), standard deviation (SD), statistical significance of the differences by using the t Student test, correlation coefficients (r) Pearson and Spearman, and the regression equations.

RESULTS AND DISCUSSION

The comparative study of immunological, biochemical and haematological parameters in the three groups conducted to quite interesting results.

- When testing the seric forms of the three cell adhesion molecules (CAM), we found a significant increase, compared to the control group, of the soluble forms of E-cadherin, ICAM-1 and VCAM-1. (Table I).

Table I. Mean values in ng/ml \pm standard error of the mean (EM) and standard deviation (SD) of CAM in the three groups of subjects.

Molecule	sE-cadherin	sICAM-1	sVCAM-1
Controls 20 subjects			
Mean \pm EM	2,94 \pm 1,223	10,75 \pm 1,536	34,80 \pm 6,493
SD	5,470	6,869	29,038
Limits	0,10-17,3	1,50-30,50	5,21-96,14
Pancreatitis 38 patients			
Mean \pm EM	26,62 \pm 4,065**	27,07 \pm 2,895**	418,08 \pm 35,322**
SD	25,061	17,844	217,739
Limits	0,58-86,24	2,36-82,30	0,36-751,38
Pancreatic tumours 37 patients			
Mean \pm EM	16,10 \pm 2,991**§	38,74 \pm 4,025**	583,03 \pm 35,836**§§
SD	18,196	24,484	217,982
Limits	0,10-90,80	4,42-115,41	116,70-946,80

Difference to controls: significance $p < 0,05$; *. Significant difference $p < 0,01$ **

Difference to pancreatitis, significance $p < 0,05$ §; significance $p < 0,01$ §§

- When testing sE-cadherin, the mean values in the patients with pancreatic tumours were significantly higher than those of controls ($p < 0,0002$), a concordant finding with immune-histochemical researches which demonstrated the reduction of the membrane form of this cell adhesion molecule in cancers. Additionally, we discovered that seric levels of sE-cadherin in patients with pancreatitis were significantly superior not only if compared with controls, ($p < 0,0001$), but also with the cancer patients ($p < 0,05$) (Table I). The raised sE-cadherin levels, not only in pancreatic tumours but also in chronic pancreatitis, pleaded for the detachment of this molecule secondary to the action of proteases in the inflammatory microenvironment (probably due to the over expression of matrix metalloproteinases and/or tumour MMP-2 and MMP-9) and not just by a truncated synthesis of sE-cadherin from the malignant cells, following an alternative mRNA splicing.

- The significant increase ($p < 0,0001$) of the soluble form of a ICAM-1/CD54 in pancreatic malignancies, but also in pancreatitis, compared to the control group, are an extra argument for the augmented action of extracellular proteases, for the diminished action of anti-proteases and for the transformation of these zymogens in active forms, under the influence of the inflammatory environment.

- The highest mean values of sVCAM-1/CD1106 were obtained in patients with pancreatic tumours, significantly superior to those found in pancreatitis ($p<0,01$) and especially compared to controls ($p<0,01$) (Table I). Because in both groups with pancreas diseases the mean values were over 10 times higher than in controls, this data also pleads for a sVCAM-1 release from the cell surface by a proteolytical cleavage realized by enzymes of the surrounding microenvironment.

Table II. Mean values \pm EM in pg/ml, SD and limit values for proinflammatory cytokines and chemokines: TNF- α , IL-6, IL-8 and MIP-3 α

	TNF- α	IL-6	IL-8	MIP-3 α
Controls 20 subjects				
Mean \pm EM	30,29 \pm 2,869	3,493 \pm 0,633	3,296 \pm 0,602	29,95 \pm 3,942
SD	12,829	2,830	2,694	17,630
Limits	17,18-61,18	0,45-9,06	0,56-9,99	7,40-62,40
Pancreatitis 38 patients				
Mean \pm EM	429,49 \pm 57,024**	20,186 \pm 2,476**	7,765 \pm 2,036*	157,51 \pm 19,099**
SD	351,522	15,260	12,549	117,734
Limits	40,12-1203,6	0,00-59,64	0,02-60,62	4,28-501,30
Pancreatic tumours 37 patients				
Mean \pm EM	270,54 \pm 45,230**§	19,480 \pm 4,047**	99,571 \pm 54,073*	259,692 \pm 20,504**
SD	275,125	24,616	328,912	124,721
Limits	10,19-978,60	0,10-105,71	6,00-1997,80	31,30-490,82

Difference to controls: significance $p<0,05$ *. Significant difference $p<0,01$ **

Difference to pancreatitis, significance $p<0,05$ §; significance $p<0,01$ §§

When testing proinflammatory cytokines, we found the following aspects:

- Significant increase of sTNF- α in pancreatitis ($p<0,01$) compared to pancreatic tumours ($p<0,05$) and to healthy controls ($p<0,01$) (Table II). The data obtained are concordant with published results about the amplification of proinflammatory cytokine production: TNF- α , IL-6 and IL-8, in pancreatitis, especially in acute pancreatitis. Our results are also confirming those of recent researches which demonstrated the increase of proinflammatory cytokines serum levels: TNF- α , IL-6, IL-2, leptin and CRP, especially in advanced cancer stages.

- Significantly superior seric levels were obtained in the case of another proinflammatory cytokine, IL-6, both in pancreatitis ($p<0,001$) and in pancreatic cancers ($p<0,001$), compared to controls (Table II).

The results obtained for chemokines were slightly different:

- Although the mean seric levels of IL-8/CXCL8 in pancreatitis were more than double compared to the healthy subjects, the differences barely reached the limit of statistical significance ($p<0,05$), as did those in tumours, because of the extreme value dispersion ($p<0,05$) (Table II). Besides, although the difference between the mean values in pancreatitis and tumours appears high, the statistical calculus demonstrated that it is not significant ($p>0,05$).

- The differences between the mean values of another chemokine, much less investigated in cancers, MIP-3 α /CCL20, the results obtained in patients with pancreatitis and neoplasias differ highly significant from those of healthy controls ($p<0,0001$). The presence of raised chemokines levels in the serum of the investigate patients by us, confirms their implication in cancer pathogenesis in general, and pancreatic cancer in particular.

- All these results demonstrate the presence of a inflammatory reaction in pancreatic cancers.

In pancreatitis patients, we found a mean value for CA19-9 (the most used marker in pancreatic cancer) of 5,76 \pm 0,736U/ml, significantly inferior ($p<0,001$) to

that from pancreatic cancer, $390,59 \pm 137,285$ U/ml, which confirms its value in differential diagnosis, even if in some pancreatitis cases the extreme values resemble the minimal values in pancreatic cancers.

The analysis of the correlations between the tested immunological parameters, as well as of the correlations between the former and biochemical parameters, has brought up unexpected and extremely interesting results, a part of which has yet not been reported before.

11. In the case of cell adhesion molecules we obtained, surprisingly, for pancreatic tumours, negative correlations with statistical significance ($p < 0,01$) for sE-cadherin with MIP-3 α ($r = -0,391$; $p = 0,008$) and with ESR ($r = -0,463$; $p = 0,007$), phenomenon not reported before, as well as a lack of correlation with sTNF- α , a cytokine which, by inducing the production of matrix metalloproteinases (MMP) could favour the detachment of E-cadherin from the malignant cell membrane.

12. In patients with pancreatitis, we found the presence of a surprising, highly significant negative correlation ($p < 0,01$) with the level of seric cholesterol ($r = -0,462$; $p = 0,007$) (fig.1). Because the consulted bibliography did not offer data, clinical or experimental, in this field, it is difficult to explain the interrelation between these two parameters, why the decrease of serum cholesterol associates with the increase of sE-cadherin, especially as it is not revealed by the testing of the pancreatic tumours patients. The mechanisms by which these interrelations are achieved open the perspective of future investigations.

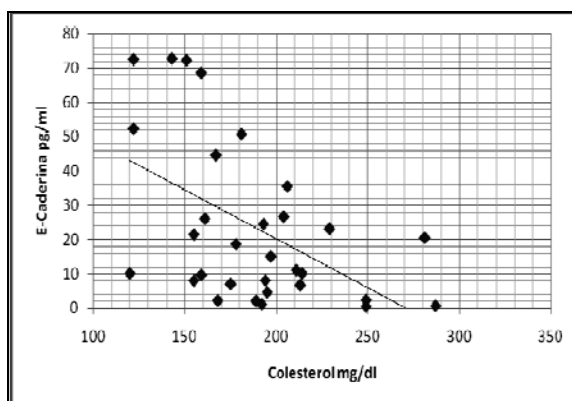


Fig.1. The negative correlation and the regression line of sE-cadherin compared to cholesterol in patients with pancreatitis ($r = -0,462$; $p = 0,007$).

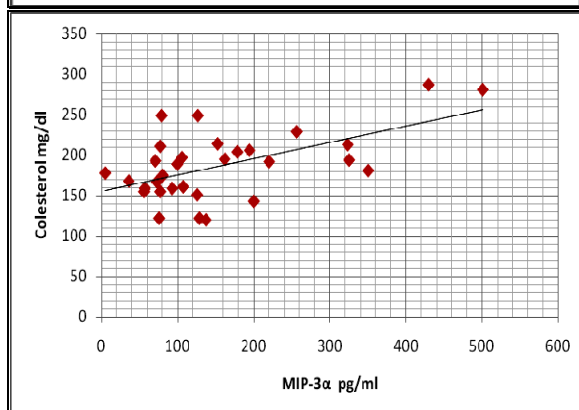


Fig.2. The correlation and regression line of serum cholesterol compared to MIP-3 α in patients with pancreatitis ($r = 0,437$; $p = 0,011$).

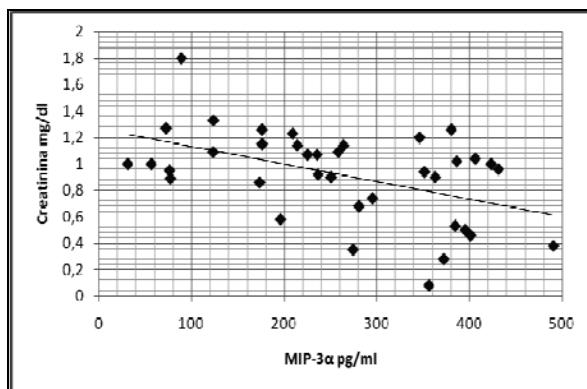


Fig.3. The correlation and regression line of serum creatinine compared to MIP-3 α in patients with pancreatic tumours ($r=0,494$; $p=0,002$).

13. Unlike the groups of the patients with pancreatic diseases, the healthy subjects presented positive correlations of sE-cadherin with IL-6 ($r=0,422$; $p<0,05$). On the contrary, the relations of sE-cadherin with MIP-3 α were negative in pancreatic tumours ($r=-0,416$; $p<0,05$).

14. The sICAM-1 molecule correlated highly significant with MIP-3 α in controls ($r=0,636$; $p<0,001$), correlation not found in patients with pancreatic diseases.

15. The data obtained demonstrated the existence of highly significant correlations of sTNF- α with the leukocyte count ($r=0,453$; $p=0,005$), with AST ($r=0,463$; $p=0,004$), ALT ($r=0,387$, $p=0,018$) and alkaline phosphatase ($r=0,399$; $p=0,029$) in pancreatic tumours, while in pancreatitis with total bilirubin ($r=0,532$; $p=0,001$) and direct bilirubin ($r=0,523$; $p=0,012$). In healthy controls, significant correlations were found only with IL-6 ($r=0,402$; $p=0,04$), another proinflammatory cytokine, which is concordant with experimental data.

16. If in the case of IL-6, we found positive significant interrelations with sE-cadherin ($r=0,422$; $p=0,032$) and negative with IL-8 ($r=-0,568$; $p=0,005$), in pancreatic tumours our results revealed, next to the same negative correlation with IL-8 ($r=-0,307$, $p<0,04$), a positive correlation with CA19-9 ($r=0,310$; $p<0,04$), similar with that found in pancreatitis ($r=0,439$; $p<0,08$).

17. If the interrelation between IL-6 and C reactive protein (CRP) was expected, due to the fact that IL-6 induces the hepatic synthesis of CRP, the inverse correlation found in pancreatitis is totally against our expectations ($r=-0,439$; $p<0,008$). More than that, in these patients we obtained significant inverse correlations with GGT ($r=-0,559$; $p=0,001$) and alkaline phosphatase ($r=-0,358$; $p=0,041$), unlike pancreatic tumours, where we found no statistically significant correlations with none of the investigated biochemical parameters. The meaning of the different behaviour of serum IL-6 in the two diseases deserves further investigation.

18. In pancreatic cancers and in healthy controls the only statistically significant correlation of the chemokine IL-8/CXCL8 was a negative one with IL-6 ($r=-0,307$; $p<0,04$), and with TNF- α respectively ($r=-0,568$; $p=0,005$), unlike pancreatitis patients, in which IL-8 correlated directly with both proinflammatory cytokines: IL-6 ($r=0,390$; $p<0,008$) și TNF- α ($r=0,353$; $p<0,02$).

19. The statistical analysis revealed, in healthy controls, the presence of some positive correlations of MIP-3 α with sICAM-1 ($r=0,636$; $p<0,001$) and negative correlations with sE-cadherin ($r=-0,416$; $p=0,034$), unlike cancer patients, where only a correlation with E-cadherin exists, is time a positive one ($r=0,391$; $p<0,008$) and pancreatitis patients, where a only a correlation with sICAM-1 ($r=0,282$; $p<0,05$) can be noted.

20. Totally unexpected and not presented in literature were the results of the statistical analysis of the relations between immunological and biochemical tests. In the

case of pancreatitis, we found significant correlations of IL-8 with alkaline phosphatase ($r=0,394$; $p=0,023$) and a proportional rise of MIP-3 α with cholesterol ($r=0,437$; $p=0,011$) (fig.2) and with blood urea ($r=0,393$; $p=0,016$). In patients with pancreatic tumours there is no interrelation between IL-8 and alkaline phosphatase, and MIP-3 α correlates significantly with ESR ($r=0,463$; $p=0,02$) and highly significant, but negatively, with serum creatinine ($r=-0,494$, $p=0,002$). (Fig.3).

CONCLUSIONS

- The analysis of the soluble forms of cell adhesion molecules: sE-cadherin, sICAM-1 and sVCAM-1 demonstrates their significant increase in the serum of patients with pancreatic cancer, compared to healthy controls.
- The fact that we found similar increases in patients with pancreatitis pleads for their production by proteolytical mechanisms, probably of extracellular nature (matrix proteases or from the inflammatory infiltrate), and not by truncated molecular synthesis due to an alternative mRNA splicing.
- The high levels of proinflammatory cytokines – TNF- α and IL-6 – in peripheral blood of the patients with tumours and with pancreatitis as well are another argument in favour of a strong inflammatory reaction in pancreatic cancer.
- At the origin of the extremely high concentrations of chemokines IL-8/CXCL8 and MIP-3 α /CCL20 in patients with malignant neoplasias of the pancreas, higher than those in pancreatitis, appears to be not only the secretion by cells of the inflammatory infiltrate, but also by tumour cells.
- Antigen CA19-9 has proven to be a useful marker, especially in advanced stage cancer.
- The study of the relationship between the tested immune parameters has lead to some interesting results, the correlations obtained in pancreatic cancers being often different from those in pancreatitis and sometimes even closer to those found in the healthy subjects.
- Totally unexpected and not mentioned before results, were obtained by analysing the correlations between the immune and biochemical and/or haematological parameters. Such is the case of the highly significant correlations revealed in pancreatic cancers: IL-8 with alkaline phosphatase; MIP-3 α with ESR, negative correlations between sE-cadherin and ESR, MIP-3 α and creatinine; TNF- α with the leukocyte count, with AST, ALT and phosphatase alkaline.
- Surprising correlations were also identified in pancreatitis: sE-cadherin with serum cholesterol, IL-8 with alkaline phosphatase and TNF- α with total and direct bilirubin.

The finding of such relationships between certain immune and biochemical parameters, correlations not reported before in literature, opens new study perspectives for the future.

CURRICULUM VITAE

I. PERSONAL DATA

Last name: Milea (Kuttlik)

First name: Viorica Ghizela Iolana

Address: Bistrița, Aleea Merilor, Bl.1, Sc.C, Ap.35, Bistrița-Năsăud County

Birth date: 18th December 1948

Birth place: Aita Mare, Covasna County

Current working place: Bistrița Hospital, Department I of Internal Medicine

Current position:

- Primary physician - Internal medicine specialty, competence in general ultrasonography
- PhD student - Department of Clinical Immunology - University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca, Romania

II. EDUCATION AND PROFESSIONAL EXPERIENCE

- Theoretical High school Nr. 2, humanistic department, Sfântu Gheorghe, Covasna – graduated in 1966
- General Medicine Faculty, University of Medicine and Pharmacy Tg. Mureș – graduated in 1972
- Clinical internship in the Territorial Clinical Hospital Nr. 1 Tg. Mureș: 1972 - 1974
- Secondary physician Internal medicine in the Territorial Clinical Hospital Nr. 1 Tg. Mureș: 1974 - 1977
- Specialist physician Internal medicine since 1977, following the national specialty exam in București
- Main Internal medicine physician in Bistrița County Hospital: 1977 - 1992
- Primary physician Internal medicine: from 1992 until present, in Bistrița County Hospital
- Competence in general ultrasonography based on the exam sustained on the 30th April 1997 in the Postgraduate Training Institute for Physicians and Pharmacists
- PhD student - Department of Clinical Immunology - University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca: 1st November 2006 - present

III. SCIENTIFIC ACTIVITY

Author or co-author in the following scientific meetings/papers:

- The 3rd National Conference of Infectious Pathology - București 27-28th September 1973 with the underlying papers:

- Marer Eva, Makai Margareta, Mathe Ildiko, L Kasza, A Palencsar, P Szekely, D Szilagyi, Viorica Kuttlik. Clinical and biological peculiarities of viral hepatitis type “A” and “B”. Revista Medicală 1973;4:313-319.
- L Kasza, Makai Margareta, Marer Eva, Mathe Ildiko, Viorica Kuttlik. Acute viral type B hepatitis by non-parenteral infection: data about its frequency by the testing of the Australia antigen. REvista Medicală 1973;4:246.
- P Szekely, L Kasza, A Palencsar, D Szilagyi, Marer Eva, Viorica Kuttlik. Perspectives of the conservative treatment in the malign viral hepatitis. Revista Medicală 1973;4:305.
- Kovendi Erzsebet, L Kasza, Makai Margareta, Mathe Ildiko, P Szekely, Marer Eva, A Palencsar, D Szilagyi, Viorica Kuttlik. Aspects in prospective prophylaxis of viral hepatitis: a 10 years experience of a post-hepatitis ambulatory. Revista Medicală 1973;4:365.
- L Kelemen, Szentkiralyi Eva, Rodica Pascu, Viorica Kuttlik. Some data regarding the clinic of epidemic parotiditis. Viața Medicală 1973;24:1111-1117.
- The 2nd Colloquium of Gastroenterology, Bistrița, October 1978:
 - Buse A, Bulbuc T, Milea Viorica . Morbidity by chronic hepatopathies in Bistrița County Hospital during 1974-1977.
- The 4th Colloquium of Gastroenterology, Bistrița, 17-18th October 1980:
 - Belascu M, Lezeu R, Bulbuc T, Viorica Milea. Etiopathogenetical factors involved in chronic hepatitis.
- The 5th Natrional Congress of Gastroenterology, București, 21-23rd May 1986:
 - Viorica Milea, Ilies Rodica, Lezeu R, Mitre R. Statistical study on the diagnosis stage of gastric cancer in patients committed to hospital in the Internal Department of the Bistrița County Hospital during 1980-1985 (Abstract book p.116).
- The 8th Colloquium of Gastroenterology, Bistrița, 7-8th October 1988:
 - Lezeu R, Buse A Viorica Milea. Inferior digestive hemorrhages by medical causes – retrospective study over ten years.
- The 9th Colloquium of Gastroenterology, Bistrița, October 1989:
 - Anton C, Ilies R, Neagos F, Viorica Milea, Bulbuc T, Neamtiu V, Lezeu R. Hemorrhagic rectocolitis in Bistrița County Hospital. Retrospective study over ten years (1979-1988).
- Viorica Milea, Miron N, Cristea V. The relationship between chronic pancreatitis and pancreatic cancer – the role of inflammation in oncogenesis. Clujul Medical 2007;4:820-826.
- Miron N, Al-Najdawi M, Patiu I, Viorica Milea, Cristea V. The development of antiphospholipidic antibodies in patients with chronic viral C hepatitis. Clujul Medical 2008;2:199-203.
- Viorica Milea, Miron N, Miron M, Cristea V. Molecular regulators of oncogenesis in pancreatic cancer. Clujul Medical 2009;1:86-91.
- Participation to the realization of the European Project for Icterus Research ICTEC, under the aegis of the European Community and guidance of Prof. S.M. Lavelle from the Institute of Clinical Research Galway, Ireland - from the 24th April 1996. For this project, I processed 50 cases of icterus in Bistrița County Hospital.

- Participation to the congresses, conferences and courses organized by the Romanian Society for Ultrasonography and the European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology, being a member of these societies.

IV. POSTGRADUATE COURSES

- Improvement Course organized by the Clinical Hospital Fundeni, București 1 – 30th June 1983: “Update in Gastroenterology”
- Improvement Course organized at the University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, 15th April – 1st May 1986: “Update in Internal Medicine”
- Improvement Course organized at the la University of Medicine and Pharmacy Tg. Mureș, 1st March – 15th April 1988: “Updates and emergencies in Internal Medicine and Cardiology”
- Practical stage in the Medical Clinic of the Cantonal Hospital in Münsterlingen, Switzerland, 22nd October – 29th November 1991
- Course of General Ultrasonography at the University of Medicine and Pharmacy Tg. Mureș 1st April – 15th May 1996
- Course of Special Ultrasonography at the Clinical Adults Hospital Cluj-Napoca, 15th January – 28th February 1997
- Pre-congress course “Echographic diagnosis of abdominal and utero-ovarian tumours” with the occasion of the First Congress of Ultrasonography in Medicine – București, 2000
- Pre-congress course “Euroson School “– Timișoara, 26-27th May 2001
- Pre-congress course “EuroSchool Vascular Ultrasonography” 25-26th May – Sibiu, 25-26th May 2002
- Pre-congress course “Echography in abdominal emergencies” – Arad, 2004
- Pre-congress course “Euroson Spring Course-Ultrasonography of Digestive Tumours” – Cluj-Napoca, 26-27th May 2005
- Pre-congress course “Ultrasonography in emergencies” – Oradea, 25-26th May 2006