

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Posibilități diagnostice în leziunile neoplazice pancreatice

---

Doctorand **Livia Cutaș (Petrușel)**

---

Conducător de doctorat Prof. dr. **Andrada Seicean**

---



# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>15</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	<b>17</b>
<b>1. Leziuni neoplazice pancreatice</b>	<b>19</b>
1.1. Adenocarcinomul pancreatic	19
1.1.1. Definiție	19
1.1.2. Epidemiologie	19
1.2. Patogeneză	20
1.2.1. Etiopatogeneză. Generalități	20
1.2.2. Rolul citoscheletului	20
1.3. Factorii de risc	20
1.3.1. Factorii de risc endogeni	20
1.3.1.1. Cancerul pancreatic familial	21
1.3.2. Factorii de risc exogeni	22
1.4. Tabloul clinic	23
1.4.1. Durerea	23
1.4.2. Cașexia	25
1.4.3. Icterul	26
1.4.4. Diabetul zaharat	26
<b>2. Metode diagnostice în cancerul pancreatic</b>	<b>27</b>
2.1. Explorările biologice	27
2.2. Explorările imagistice	27
2.2.1. Ecografia abdominală	27
2.2.2. Ecoendoscopia	28
<b>3. Tratament și prognostic în cancerul de pancreas</b>	<b>31</b>
3.1. Tratamentul chirurgical	31
3.2. Tratamentul paliativ	33
3.2.1. Tratamentul paliativ al icterului	33
3.2.2. Tratamentul paliativ al stenozei duodenale	33
3.2.3. Tratamentul durerii	34
3.2.4. Tratamentul radiochimioterapic	34
3.3. Terapii noi	35
3.3.1. Imunoterapia pasivă	36
3.3.1.1. Terapiile antikinazice	36
3.3.1.2. Terapia împotriva genelor reparatoare ale ADNului defectuoase	37
3.3.1.3. Terapia împotriva histon-deacetilazelor	37
3.3.1.4. Terapia anti microARN	37
3.3.1.5. Terapia împotriva compartimentelor stromale	38
3.3.2. Imunoterapia specifică	40
3.3.3. Imunoterapia țintită pe celulele stem tumorale	43
3.4. Prognosticul cancerului de pancreas	44

<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	<b>45</b>
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	<b>47</b>
<b>2. Metodologie generală</b>	<b>49</b>
<b>3. Studiu 1. Factorii de risc în cancerul pancreatic: interrelația acestora cu cancerul familial pancreatic și rolul prognostic</b>	<b>51</b>
3.1. Introducere	51
3.2. Ipoteza de lucru	52
3.3. Material și metodă	52
3.4. Rezultate	53
3.5. Discuții	60
3.6. Concluzii	63
<b>4. Studiu 2. Relația între cașexie și invazia perineurală în cancerul pancreatic</b>	<b>65</b>
4.1. Introducere	65
4.2. Ipoteza de lucru	66
4.3. Material și metodă	66
4.4. Rezultate	69
4.5. Discuții	83
4.6. Concluzii	86
<b>5. Studiu 3. Expresia serică a biomarkerului citoscheletului celular în cancerul de pancreas</b>	<b>87</b>
5.1. Introducere	87
5.2. Ipoteza de lucru	87
5.3. Material și metodă	87
5.4. Rezultate	91
5.5. Discuții	100
5.6. Concluzii	102
<b>6. Studiu 4. Asocierea profilului seric JAK/STAT cu statusul inflamator în cancerul de pancreas</b>	<b>103</b>
6.1. Introducere	103
6.2. Ipoteza de lucru	103
6.3. Material și metodă	104
6.4. Rezultate	106
6.5. Discuții	109
<b>7. Discuții generale</b>	<b>111</b>
<b>8. Concluzii generale</b>	<b>117</b>
<b>9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	<b>119</b>
<b>REFERINȚE</b>	<b>121</b>

**Cuvinte-cheie:** adenocarcinom ductal pancreatic, factorii de risc, cașexie, invazie perineurală, status inflamator, citoschelet

# INTRODUCERE

Patologia tumorală a pancreasului este un subiect major de interes în practica zilnică, fiind clasat pe locul 3 în ceea ce privește mortalitatea prin cancer, dar este de așteptat să ajungă a doua cauză principală a mortalității prin cancer în 2030. În ultimii ani, incidența cancerului pancreatic a crescut. Reprezintă aproximativ 2% din toate tipurile de cancer și este asociat cu 5% din decesele cauzate de cancer. Majoritatea pacienților nu prezintă simptome evidente în timpul dezvoltării bolii și a progresiei către boală pancreatică metastatică. Diagnosticul precoce este dificil, cancerul pancreatic devenit una dintre cele mai mortale tumori maligne. Evoluția bolii este imprezvizibilă, chiar și după un potențial tratament radical, rata de supraviețuire a pacientului la 5 ani este de doar 2-9%. Cele două tipuri principale de cancer pancreatic sunt reprezentate de adenocarcinomul pancreatic (care reprezintă aproximativ 85% din cazuri) și tumorile endocrine pancreatice (care constituie mai puțin de 5% din toate cazurile). Adenocarcinomul ductal pancreatic (PDAC) este cel mai frecvent în rândul pacienților cu PC.

Cauzele cancerului de pancreas sunt încă insuficient cunoscute, deși au fost identificați anumiți factori de risc, precum fumatul, istoricul familial pozitiv și genetica, diabetul zaharat, obezitatea, factorii alimentari, consumul de alcool.

Lucrarea de față își propune o mai bună înțelegere a patogenezei cancerului de pancreas, cu evidențierea factorilor de risc prezenți în populația noastră la pacienții cu adenocarcinom pancreatic comparativ cu cei cu tumori neuroendocrine pancreatice și pacienți sănătoși; respectiv înțelegerea unor mecanisme etiopatogenetice precum cașexia, durerea și asocierea acestora, împreună ducând la scăderea calității vieții.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Stadiul actual al cunoașterii este cuprins în 3 capitole. În aceste capitole sunt redată datele cele mai importante și de noutate din literatura de specialitate referitoare la cancerul pancreatic.

Primul capitol, Leziuni neoplazice pancreatice, constă în definirea adenocarcinomului pancreatic și prezentarea impactului pe care această patologie îl are din punct de vedere epidemiologic, patogenetic, clinic și punând accent pe principalii factori de risc (endogeni, exogeni) din cancerul pancreatic. În cadrul descrierii tabloului clinic sunt detaliate patogeneza durerii și a cașexiei, realizând o introducere a studiilor originale cuprinse în această teză.

Al doilea capitol, Metode diagnostice în cancerul pancreatic, descrie principalele metode biologice și imagistice, care au ca scop identificarea formațiunii pancreatice, realizarea bilanțului de extensie preterapeutic și confirmarea naturii histologice. Este discutat rolul ecoendoscopiei în diagnosticul cancerului de pancreas.

În al treilea capitol sunt prezentate principalele metode de tratament, incluzând tratamentul chirurgical, paleativ, respectiv noile terapii țintite dezvoltate în cancerul de pancreas. Este descrisă imunoterapia pasivă care include terapiile antikinazice, terapiile împotriva genelor reparatoare ale AND-ului, împotriva histon-deacetilazelor, terapia anti microARN-ului, împotriva compartimentelor stromale și terapiile antiangiogenetice. Imunoterapia specifică cuprinde vaccinurile pe bază de celule integrale tumorale, vaccinurile peptidice și vaccinurile pe bază de celule dendritice, implicit imunoterapia țintită pe celulele stem tumorale. Scopul tratamentelor noi este de a obține un răspuns tumoral mai intens și mai durabil. Tot în acest capitol sunt descriși factorii de prognostic din cancerul pancreatic.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

În studiul 1 cu titlul “**Factorii de risc în cancerul pancreatic: interrelația acestora cu cancerul familial pancreatic și rolul prognostic**” publicat în *Journal of Gastrointestinal and Liver Disease*, au fost evaluați factorii de risc în adenocarcinomul ductal pancreatic și în cancerul pancreatic familial, precum și prezența factorilor de risc la pacienții cu adenocarcinom ductal pancreatic în comparație cu pacienții cu tumori neuroendocrine sau la pacienții sănătoși, asociat cu evaluarea rolului predictiv al acestora asupra supraviețuirii. În România rolul prognostic al factorilor de risc pentru adenocarcinomul pancreatic, precum vârsta, fumatul, pancreatita cronică, diabetul zaharat și obezitatea nu este cunoscut. Importanța acestora în dezvoltarea cancerului în familiile cu un istoric de adenocarcinom sunt puțin studiate.

**Material și metodă.** Pentru acest studiu, am colectat prospectiv date de la pacienții diagnosticați cu PC provenind din două centre medicale terțiare din România, recrutând astfel un număr total de 624 de pacienți care au inclus 312 de cazuri de cancer confirmate histopatologic și 312 de pacienți sănătoși. Cazurile și controalele au fost în raport de 1: 1 în funcție de sex și vârstă. Am colectat informații cu privire la date demografice, factorii de risc, date legate de diagnostic, stadializare, terapie și supraviețuire.

**Rezultate.** Au fost incluși în studiu 312 pacienți cu cancer pancreatic (279 cu adenocarcinom ductal pancreatic și 24 pacienți cu tumori neuroendocrine și nouă pacienți cu alte tipuri histologice maligne) și 312 martori. Media indicelui de masă corporală a fost semnificativ mai mare la pacienții cu tumori neuroendocrine. Istoricul de cancer pancreatic familial a fost găsit la 4% dintre pacienții cu cancer pancreatic. Riscul de carcinom pancreatic familial a fost asociat cu prezența diabetului nou-diagnosticat (OR: 4,64,  $p=0,018$ ). Analiza logistică multivariată a sugerat că vârsta înaintată (OR: 1,67), fumatul (OR: 1,67), indicele de masă corporală scăzut (OR: 12,07) și diabetul (OR: 3,91) au fost factori de risc pentru cancerul pancreatic. Analiza de supraviețuire globală după ajustarea pentru vârstă și stadiul tumorii a arătat doar stadiul tumoral avansat (HR=1,6,  $p=0,003$ ) și metastazele ca fiind factori predictorii independenți (HR=1,67,  $p<0,001$ ). În **concluzie**, datele noastre sugerează faptul că diabetul, fumatul, subponderabilitatea și vârsta peste 60 de ani sunt factori de risc pentru adenocarcinomul pancreatic. Pe lângă factorii de risc cunoscuți pentru cancerul pancreatic, un istoric familial de cancer pancreatic este un factor de risc important de luat în considerare pentru screening. Pacienții cu antecedente familiale de PC, în special cei cu diabet zaharat nou-diagnosticat, trebuie urmăriți cu atenție și trebuie luați în considerare pentru studii de screening pentru a detecta precoce PC. Nu a existat nicio asociere între sex, fumat, consumul de alcool, diabet, suprapondere sau obezitate, pancreatită cronică și supraviețuirea globală. Stadiul tumoral avansat a fost identificat ca un predictor independent pentru supraviețuirea globală.

În cel de-al doilea studiu intitulat “**Relația între cașexie și invazia perineurală în cancerul pancreatic**” publicat în *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, am determinat legătura dintre cașexie și invazia perineurală la pacienții cu PDAC prin utilizarea caracteristicilor clinico-patologice și a nivelurilor de expresie proteică a Activinei și Midkine în plasma și țesuturile pacienților în comparație cu pacienții sănătoși. De asemenea am evaluat rolul prognostic al Activinei și Midkine în supraviețuire și metastazare.

Cașexia este responsabilă pentru calitatea scăzută a vieții în adenocarcinomul pancreatic. Progresia rapidă a bolii și deteriorarea pacientului par a fi legate de invazia perineurală, dar relația dintre cașexie și invazia perineurală în evoluția cancerului pancreatic a fost puțin studiată. Deoarece invazia perineurală este dificil de evidențiat, un biomarker precum factorul neurotrofic Midkine (MK) care este implicat în diferențierea neuronală și migrarea celulară ar putea fi de ajutor. De asemenea, Activin (ACV) a fost descris ca un biomarker al cașexiei din PDAC. Cu toate acestea, rolul lor pentru evaluarea și precizarea evoluției bolii în practica zilnică nu este cunoscut.

**Material și metodă.** Acest studiu a inclus pacienți cu adenocarcinom dovedit care au fost înrolați prospectiv și un grup de control, fără afecțiuni maligne. Pacienții cu alte cauze de malnutriție au fost excluși. Nivelurile plasmatiche de ACV și MK au fost analizate prin western blot și au fost corelate cu caracteristicile clinicopatologice și datele referitoare la supraviețuire. Aceste rezultate au fost validate prin analize imunohistochimice ale țesutului tumoral pancreatic al pacienților incluși în studiu și un grup suplimentar de specimene rezecate chirurgical de la pacienți cu o boală benignă.

**Rezultate.** Studiul a cuprins 114 pacienți cu PDAC, 125 martori și un grup suplimentar de 14 probe de țesut pancreatic benign. ACV și MK au fost ambele supraexprimate mai frecvent în plasma pacienților cu PDAC decât la controale (63% vs 32% pentru ACV,  $P < 0,001$ ; 47% vs 16% pentru MK,  $P < 0,001$ ), cu niveluri similare în țesutul pancreatic, expresia proteinei MK a fost strâns corelată cu stadiul tumoral avansat ( $p = 0,006$ ), prezența metastazelor ( $p = 0,04$ ), invazia perineurală ( $p = 0,03$ ) și diabet ( $P = 0,002$ ), dar fără influență asupra supraviețuirii. Nu a fost observată nicio corelație între factorii clinicopatologici și expresia ACV. Cașexia, prezentă la 19% dintre pacienți, nu a avut legătură cu nivelul ACV sau MK. Expresia mai mare a ACV a fost asociată cu o supraviețuire mai redusă ( $p = 0,008$ ).

În **concluzie** datele prezentate sugerează că MK este un biomarker util pentru invazia perineurală, fiind, de asemenea, corelat cu stadiul avansat al tumorii, prezența metastazelor și diabetul. Din păcate, invazia perineurală și

expresia activinei nu a fost corelată cu cașexia, dar ACV ar putea fi un biomarker eficient pentru precizarea prognosticului negativ la pacienții cu PDAC și ar putea fi un nou marker terapeutic pentru țintirea selectivă a celulelor canceroase.

Cel de-al treilea studiu intitulat “**Expresia serică a biomarkerului citoscheletului celular în cancerul de pancreas**” publicat în *Clinics in Oncology* evaluează semnificația exprimării proteinei ezrin în PDAC în raport cu stadiul clinic și supraviețuirea.

Citoscheletul intracelular ar putea fi un factor cheie în precizarea prognosticului slab în adenocarcinomul ductal pancreatic. În prezent lipsesc biomarkeri de încredere care sunt implicați în dezvoltarea citoscheletului. Ezrin este implicat în semnalizarea și adeziunea intracelulară, prin legarea în căile PI3K/Akt.

**Material și metodă.** Acest studiu de cohortă prospectiv a înrolat pacienți cu adenocarcinom confirmat histopatologic și un grup de control, fără afecțiuni maligne. Au fost analizate nivelurile plasmatiche de ezrin folosind western blot și au fost corelate cu caracteristicile clinicopatologice și datele de supraviețuire. Aceste rezultate au fost validate prin analize imunohistochimice ale țesutului tumoral pancreatic al pacienților incluși în studiu și un grup suplimentar de specimene rezecate chirurgical de la pacienții cu patologie pancreatică benignă.

**Rezultate.** Studiul a cuprins 51 de pacienți cu PDAC, 53 pacienți de control și un grup suplimentar de 13 probe de țesut pancreatic normal. EZR a fost supraexprimat mai frecvent în plasma pacienților cu PDAC decât la martori (80% vs. 32%,  $P < 0,001$ ). EZR a fost detectat în țesutul tumoral prin aspirație cu ac fin prin intermediul imunohistochimiei și nu a fost corelat semnificativ cu expresia plasmatică a acestuia. Expresia proteinei EZR a fost strâns legată de stadiul clinic avansat ( $p = 0,02$ ), iar riscul de metastazare a fost de cinci ori mai mare ( $p = 0,048$ ) și fără nicio influență asupra supraviețuirii.

În **concluzie** expresia Ezrin ca biomarker intracelular al citoscheletului este legată de extensia locală și metastazarea PDAC, dar nu și de supraviețuire.

În cel de-al patrulea studiu intitulat “**Asocierea profilului seric JAK/STAT cu statusul inflamator în cancerul de pancreas**” publicat în *Cellular and Molecular Biology* este evaluată semnificația nivelurilor serice ale expresiei JAK/STAT3 și citokinelor inflamatorii în PDAC în relație cu caracteristicile clinicopatologice și prognosticul pacienților cu cancer de pancreas.

Caracterizarea genetică actuală a adenocarcinomului ductal pancreatic nu integrează reacția gazdei la celulele canceroase și nu poate prezice răspunsul la chimio- sau imunoterapie. Calea JAK/STAT este un factor important al inflamației cancerului mediat de citokine, dar relația sa cu carcinogeneza pancreatică și rolul potențialilor biomarkeri nu este încă stabilită.

**Material și metodă.** Acest studiu de cohortă prospectiv a inclus pacienți cu adenocarcinom dovedit și un grup de control, fără afecțiuni maligne. Au fost evaluate expresia serică a IL2, 6, 8, 17, JAK2 și STAT3 prin teste ELISA în aceste două grupuri. Pacienții cu PDAC au fost urmăriți timp de 24 de luni. A fost utilizat un model de analiză multivariată de regresie Cox pentru a determina factorii care influențează supraviețuirea.

**Rezultate.** Studiul a cuprins 56 de pacienți cu PDAC și 56 de control. Serul suprareglat JAK2/STAT3 sau citokinele au fost prezente la aproximativ jumătate dintre pacienții cu PDAC, similar cu martorii. Expresia JAK2 în serul pacienților cu PDAC a fost asociată semnificativ cu exprimarea IL2 ( $p = 0,03$ ) și IL6 ( $p = 0,02$ ), dar nu cu supraviețuirea sau dezvoltarea metastazelor. Doar vârsta și prezența metastazelor ganglionare au fost asociate cu o supraviețuire redusă în analizele multivariate.

În **concluzie** am furnizat date despre care calea JAK2 este legată de starea inflamatorie la pacienții cu PDAC, dar nivelul lor seric nu este supraexprimat comparativ cu controale. De asemenea, nu am putut dovedi o influență asupra prognosticului acestor pacienți. Cu toate acestea, studiile suplimentare sunt necesare pentru a înțelege mai bine mecanismul și consecința activării JAK și STAT3 în PDAC. Expresia STAT 3/JAK2, deși corelată cu starea inflamatorie (IL2, IL6), nu a fost supraexprimată în PDAC în comparație cu martorii și nu s-a dovedit nicio valoare prognostică.

## Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Din punct de vedere științific, contribuțiile originale din perioada de cercetare a lucrării de doctorat sunt după cum urmează:

- S-a efectuat primul studiu național cu privire la asocierea factorilor de risc în cancerul pancreatic. Studiul a demonstrat faptul că diabetul, fumatul, subponderabilitatea și vârsta peste 60 de ani sunt factori de risc pentru PDAC, iar antecedentele familiale de PC în special la cei cu diabet zaharat nou diagnosticat sunt factori de risc importanți de luat în considerare pentru screening;
- Este primul studiu din literatura românească de specialitate care arată frecvența cancerului familial de pancreas de 4% la o cohortă de 300 de pacienți cu tumori pancreatice. Vârsta de apariție a cancerului de pancreas la cei cu istoric familial este similar cu cei cu adenocarcinom pancreatic sporadic, dar diabetul nou diagnosticat reprezintă un factor de risc important;
- De asemenea, doar o zecime dintre tumorile pancreatice identificate sunt neuroendocrine,
- Cașexia nu s-a dovedit asociată cu nivelul seric de midkine, marker de invazie perineurală, și activine,
- Numai nivelul seric de activin a avut rol prognostic, corelându-se cu supraviețuirea;
- Stadiul tumoral avansat și metastazarea s-au asociat cu nivelul seric de activin și ezrin;
- inflamația cronică (IL și JAK/STAT3) nu este supraexprimată în PDAC față de control, deși nivelurile de IL și JAK serice au fost corelate între ele,
- Din cunoștințele noastre subiectele actualei cercetări sunt prezentate în premieră la nivel național, studiile efectuate fiind printre puținele de acest gen în literatura de specialitate la momentul publicării lor.

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

---

# Diagnostic possibilities in pancreatic neoplastic lesions

---

Doctoral candidate **Livia Cutaș (Petrușel)**

---

Doctoral supervisor Prof.dr. **Andrada Seicean**

---





# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	<b>17</b>
<b>1. Pancreatic neoplastic lesion</b>	<b>19</b>
<b>1.1. Pancreatic adenocarcinoma</b>	<b>19</b>
1.1.1. Definition	19
1.1.2. Epidemiology	19
<b>1.2. Pathogenesis</b>	<b>20</b>
1.2.1. Etiopathogenesis. Overview	20
1.2.2. The role of the cytoskeleton	20
<b>1.3. Risk factors</b>	<b>20</b>
1.3.1. Endogenous risk factors	20
1.3.1.1. Familial pancreatic cancer	21
1.3.2. Exogenous risk factors	22
<b>1.4. The clinical picture</b>	<b>23</b>
1.4.1. Pain	23
1.4.2. Cachexia	25
1.4.3. Jaundice	26
1.4.4. Diabetes mellitus	26
<b>2. Diagnostic methods in pancreatic cancer</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Biological explorations</b>	<b>27</b>
<b>2.2. Imaging studies</b>	<b>27</b>
2.2.1. Abdominal ultrasound	27
2.2.2. Endoscopic ultrasonography	28
<b>3. Treatment and prognosis in pancreatic cancer</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Surgical treatment</b>	<b>31</b>
<b>3.2. Palliative treatment</b>	<b>33</b>
3.2.1. Palliative treatment of jaundice	33
3.2.2. Palliative treatment of duodenal stenosis	33
3.2.3. Pain treatment	34
3.2.4. Radiochemotherapy treatment	34
<b>3.3. New therapies</b>	<b>35</b>
3.3.1. Passive immunotherapy	36
3.3.1.1. Antikinase therapies	36
3.3.1.2. Therapy against defective DNA repair genes	37
3.3.1.3. Therapy against histone deacetylases	37
3.3.1.4. Anti microRNA therapy	37
3.3.1.5. Therapy against stromal compartments	38
3.3.2. Specific immunotherapy	40
3.3.3. Immunotherapy targeted at tumor stem cells	43
<b>3.4. Pancreatic cancer prognosis</b>	<b>44</b>

<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	<b>45</b>
<b>1. Working hypothesis / objectives</b>	<b>47</b>
<b>2. General methodology</b>	<b>49</b>
<b>3. Study 1. Risk factors in pancreatic cancer: their interrelationship with familial pancreatic cancer and prognostic role</b>	<b>51</b>
3.1. Introduction	51
3.2. Working hypothesis/objectives	52
3.3. Material and method	52
3.4. Results	53
3.5. Discussion	60
3.6. Conclusions	63
<b>4. Study 2. Relationship between cachexia and perineural invasion in pancreatic cancer</b>	<b>65</b>
4.1. Introduction	65
4.2. Working hypothesis/objectives	66
4.3. Material and method	66
4.4. Results	69
4.5. Discussion	83
4.6. Conclusions	86
<b>5. Study 3. Serum expression of cellular cytoskeleton biomarker in pancreatic cancer</b>	<b>87</b>
5.1. Introduction	87
5.2. Working hypothesis/objectives	87
5.3. Material and method	87
5.4. Results	91
5.5. Discussion	100
5.6. Conclusions	102
<b>6. Study 4. Association of serum JAK/STAT profile with inflammatory status in pancreatic cancer</b>	<b>103</b>
6.1. Introduction	103
6.2. Working hypothesis/objectives	103
6.3. Material and method	104
6.4. Results	106
6.5. Discussion	109
<b>7. General discussion</b>	<b>111</b>
<b>8. General conclusions</b>	<b>117</b>
<b>9. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	<b>119</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>121</b>

Keywords: pancreatic ductal adenocarcinoma, risk factors, cachexia, perineural invasion, inflammatory status, cytoskeleton

# INTRODUCTION

Tumor pathology of the pancreas is a major topic of interest in daily practice, being ranked 3rd in terms of cancer mortality, but is expected to reach the second leading cause of cancer mortality in 2030. In recent years, the incidence of cancer pancreatic has increased. It accounts for about 2% of all cancers and is associated with 5% of cancer deaths. Most patients have no obvious symptoms during disease development and progression to metastatic pancreatic disease. Early diagnosis is difficult, pancreatic cancer has become one of the deadly malignant tumors. The evolution of the disease is unpredictable, even after a potentially radical treatment, the patient's survival rate at 5 years is only 2-9%. The two main types of pancreatic cancer are pancreatic adenocarcinoma (which accounts for about 85% of cases) and pancreatic endocrine tumors (which account for less than 5% of all cases). Pancreatic ductal adenocarcinoma is most common among patients with pancreatic cancer. The causes of pancreatic cancer are still insufficiently known, although certain risk factors have been identified, such as smoking, positive family history and genetics, diabetes, obesity, dietary factors, alcohol consumption.

The present work aims to better understand the pathogenesis of pancreatic cancer, highlighting the risk factors present in our population in patients with pancreatic adenocarcinoma compared to those with pancreatic neuroendocrine tumors and healthy patients; respectively the understanding of some etiopathogenetic mechanisms such as cachexia, pain and their association, together leading to a decrease in the quality of life.

## CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The current state of knowledge is contained in 3 chapters. In these chapters, the most important and new data from the specialized literature related to pancreatic cancer are presented. The first chapter, Pancreatic neoplastic lesions, consists of defining pancreatic adenocarcinoma and presenting the impact that this pathology has from the epidemiological, pathogenetic and clinical point of view and emphasizing the main risk factors (endogenous, exogenous) in pancreatic cancer. In the description of the clinical picture, the pathogenesis of pain and cachexia are detailed, making an introduction to the original studies contained in this thesis. The second chapter, Diagnostic methods in pancreatic cancer, describes the main biological and imaging methods, which aim to identify the pancreatic tumor, perform the pretherapeutic extension balance and confirm the histological nature. The role of ultrasound endoscopy in the diagnosis of pancreatic cancer is discussed. In the third chapter, the main treatment methods are presented, including surgical, palliative treatment, respectively the new targeted therapies in pancreatic cancer. Passive immunotherapy including anti-kinase therapies, anti-DNA repair gene therapies, anti-histone deacetylases, anti-microRNA therapy, anti-stromal compartment and anti-angiogenic therapies is described. Specific immunotherapy includes vaccines based on integral tumor cells, peptide vaccines and vaccines based on dendritic cells, implicitly immunotherapy targeted at tumor stem cells. The goal of the new treatments is to achieve a more intense and lasting tumor response. Prognostic factors in pancreatic cancer are also described in this chapter.

## PERSONAL CONTRIBUTION

In study 1 entitled "**Risk factors in pancreatic cancer: their interrelation with familial pancreatic cancer and prognostic role**" published in the *Journal of Gastrointestinal and Liver Disease*, risk factors in pancreatic ductal adenocarcinoma and familial pancreatic cancer were evaluated, as well as the presence of risk factors in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma compared to patients with neuroendocrine tumors or healthy patients, associated with the assessment of their predictive role on survival. In Romania, the prognostic role of risk factors for pancreatic adenocarcinoma, such as age, smoking, chronic pancreatitis, diabetes and obesity, is not known. Their importance in the development of cancer in families with a history of adenocarcinoma is little studied. Material and method. For this study, we prospectively collected data from patients diagnosed with PC from two tertiary medical centers in Romania, thus recruiting a total number of 624 patients that included 312 histopathologically confirmed cancer cases and 312 healthy patients. Cases and controls were in a 1:1 ratio for sex and age. We collected information on demographics, risk factors, data related to diagnosis, staging, therapy, and survival.

**Results:** 312 pancreatic cancer patients (279 with pancreatic ductal adenocarcinoma and 24 patients with neuroendocrine tumors, and nine patients with other malignant types) and 312 controls were included. The median body mass index was significantly higher in patients with neuroendocrine tumors. Positive family history for pancreatic cancer was found in 4% of patients with pancreatic cancer. The risk for familial pancreatic carcinoma was associated with the presence of new-onset diabetes (OR: 4.64,  $p=0.018$ ). The multivariate logistic analysis suggested that advanced age (OR: 1.67), smoking (OR: 1.67), low body mass index (OR: 12.07), and diabetes (OR: 3.91) were risk factors for pancreatic cancer. The overall survival analysis after adjustment for age and tumor stage showed only advanced tumoral stage (HR=1.6,  $p=0.003$ ) and metastasis as independent predicting factors (HR=1.67,  $p<0.001$ ).

In **conclusions** our study suggests that diabetes, smoking, underweight, and age over 60 years are risk factors for pancreatic cancer. Patients with a family history of pancreatic cancer, especially those with new-onset diabetes, should be followed carefully and considered for screening. Only an advanced tumor stage was associated with poor overall survival for patients with pancreatic ductal adenocarcinoma.

In the second study entitled "**The relationship between cachexia and perineural invasion in pancreatic cancer**" published in the *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, we determined the link between cachexia and perineural invasion in PDAC patients by using clinicopathological features and expression levels protein levels of Activin and Midkine in plasma and tissues of patients compared to healthy patients. We also assessed the prognostic role of Activin and Midkine in survival and metastasis. Cachexia is responsible for poor quality of life in pancreatic adenocarcinoma. Rapid disease progression and patient deterioration appear to be related to perineural invasion, but the relationship between cachexia and perineural invasion in the evolution of pancreatic cancer has been little studied. As perineural invasion is difficult to detect, a biomarker such as neurotrophic factor Midkine (MK) which is involved in neuronal differentiation and cell migration could be helpful. Activin (ACV) has also been described as a biomarker of cachexia in PDAC. However, their role for evaluating and predicting disease progression in daily practice is not known.

**Material and method.** This study included prospectively enrolled patients with proven adenocarcinoma and a matched group of controls without any malignancies. Patients with other causes of malnutrition were excluded. The plasma levels of ACV and MK were analyzed using western blotting and were correlated with the clinicopathological features and survival data. These results were validated by immunohistochemical analyses of the pancreatic tumor tissue of the patients included in the study and a supplementary group of surgically resected specimens from patients with a benign disease.

**Results.** The study comprised 114 patients with PDAC, 125 controls and a supplementary group of 14 benign pancreatic tissue samples. ACV and MK were both overexpressed more frequently in the plasma of patients with PDAC than in the controls (63% vs 32% for ACV,  $P < 0.001$ ; 47% vs 16% for MK,  $P < 0.001$ ), with similar levels in pancreatic tissue the MK protein expression was closely related to the advanced clinical stage ( $P = 0.006$ ), the presence of metastasis ( $P = 0.04$ ), perineural invasion ( $P = 0.03$ ) and diabetes ( $P = 0.002$ ), but with no influence on survival. No correlation between clinicopathological factors and ACV expression was noted. Cachexia, present in 19% of patients, was unrelated to ACV or MK level. Higher ACV expression was associated with a shorter survival ( $P = 0.008$ ).

In **conclusion**, the presented data suggest that the MK was a biomarker of perineural invasion, associated with tumor stage and diabetes, but without prognostic value as ACV. Cachexia was unrelated to perineural invasion, ACV level or survival.

The third study entitled "**Serum Cytoskeleton Biomarker Expression in Pancreatic Cancer**" published in *Clinics in Oncology* evaluates the significance of ezrin protein expression in PDAC in relation to clinical stage and survival. Intracellular cytoskeleton could be a key factor in predicting poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. Reliable biomarkers that are involved in cytoskeleton development are currently lacking. Ezrin is involved in intracellular signaling and adhesion by binding to the PI3K/Akt pathways.

**Material and method.** This prospective cohort study enrolled patients with proven adenocarcinoma and a matched group of controls without any malignancies. The plasma levels of ezrin were analyzed using western blotting and were correlated with the clinicopathological features and survival data. These results were validated by immunohistochemical analyses of the pancreatic tumor tissue of the patients included in the study and a supplementary group of surgically resected specimens from patients with a benign disease.

**Results:** The study comprised 51 patients with PDAC, 53 controls and a supplementary group of 13 normal pancreatic tissue samples. EZR was over expressed more frequently in the plasma of patients with PDAC than in the controls (80% vs. 32%,  $P<0.001$ ). EZR was detected in the fine needle aspiration tumor tissue by immunohistochemistry and it was not significantly correlated with its plasma expression. The EZR protein expression was closely related to the

advanced clinical stage ( $P=0.02$ ), and the risk of metastasis was five times higher ( $P=0.048$ ) and with no influence on survival.

In **conclusions**, Ezrin pathway as an intracellular cytoskeleton biomarker is related to the local spread and metastasis of PDAC, but not in the survival.

In the fourth study entitled "**Association of serum JAK/STAT profile with inflammatory status in pancreatic cancer**" published in *Cellular and Molecular Biology*, the significance of serum levels of JAK/STAT3 expression and inflammatory cytokines in PDAC is evaluated in relation to clinicopathological characteristics and the prognosis of pancreatic cancer patients. Current genetic characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma does not integrate host response to cancer cells and cannot predict response to chemotherapy or immunotherapy. The JAK/STAT pathway is an important factor of cytokine-mediated cancer inflammation, but its relationship with pancreatic carcinogenesis and the role of potential biomarkers is not yet established.

**Material and method.** This prospective cohort study included patients with proven adenocarcinoma and a matched group of controls without any malignancies. There were evaluated the serum expression of IL2, 6, 8, 17, JAK2, and STAT3 by ELISA assays in these two groups. The PDAC patients were followed up for 24 months. A Cox regression multivariate analysis model was used to determine factors influencing survival.

**Results.** The study comprised 56 patients with PDAC and 56 controls. The upregulated serum JAK2/STAT3 or cytokines were present in about half of the patients with PDAC, similar to controls. The expression of JAK2 in serum of PDAC patients was significantly associated with the expression of IL2 ( $p=0.03$ ) and IL6 ( $p=0.02$ ) but not with survival or metastasis development. Only age and the presence of lymph node metastases were associated with reduced survival in multivariate analyses.

In **conclusion** we have provided data that the JAK2 pathway is related to the inflammatory state in PDAC patients, but their serum level is not overexpressed compared to controls. We also could not prove an influence on the prognosis of these patients. However, further studies are needed to better understand the mechanism and consequence of JAK and STAT3 activation in PDAC. STAT 3/JAK2 expression, although correlated with inflammatory status (IL2, IL6), was not overexpressed in PDAC compared to controls and no prognostic value was proven.

## Originality and innovative contributions of the thesis

From a scientific point of view, the original contributions from the research period of the doctoral thesis are as follows:

- The first national study on the association of risk factors in pancreatic cancer was carried out. The study demonstrated that diabetes, smoking, underweight and age over 60 are risk factors for PDAC, and family history of PC especially in those with newly diagnosed diabetes are important risk factors to consider for screening;
- It is the first study in Romanian specialized literature that shows the frequency of familial pancreatic cancer of 4% in a cohort of 300 patients with pancreatic tumors. Age of onset of pancreatic cancer in those with a family history is similar to those with sporadic pancreatic adenocarcinoma, but newly diagnosed diabetes is an important risk factor;
- Also, only one tenth of the identified pancreatic tumors are neuroendocrine
- Cachexia was not shown to be associated with the serum level of midkine, a marker of perineural invasion, and activin;
- Only the serum level of activin had a prognostic role, correlating with survival;
- Advanced tumor stage and metastasis were associated with serum activin and ezrin levels;
- chronic inflammation (IL and JAK/STAT3) is not overexpressed in PDAC vs. control, although serum IL and JAK levels were correlated with each other;
- From our knowledge, the subjects of the current research are presented for the first time at the national level, the studies conducted being among the few of this kind in the specialized literature at the time of their publication.