



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE**

**"CAROL DAVILA" BUCUREȘTI**

**CATEDRA DE CHIRURGIE IV SUUB**

**SPITALUL UNIVERSITAR DE URGENȚĂ BUCUREȘTI**

*Diagnostic molecular al Cancerului de Pancreas prin  
senzori stochastici confirmat histopatologic postoperator*

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător științific:**

**PROF. DR. SORIN MIRCEA OPRESCU**

**Doctorand:**

**Medic IURIE TURCAN**

**2019**

**BUCUREȘTI**



## CUPRINS

<b>1. INTRODUCERE .....</b>	<b>4</b>
1.1. Context .....	4
<b>2. PARTEA GENERALĂ .....</b>	<b>4</b>
2.1. Aspecte Generale Ale Managementului Cancerului De Pancreas.....	4
2.2. Epidemiologia și factorii de risc .....	4
2.3. Patogenia Tumorilor pancreatice.....	5
2.4. Markerii Moleculari De Predicție În Cancerul De Pancreas .....	5
2.5. Diagnosticul Histopatologic .....	6
2.6. Diagnostic Imunohistochimic - IHC.....	7
2.7. Diagnostic Imagistic.....	7
2.7.1 Examinarea cu ultrasunete la nivel abdominal (ecografia transabdominală) .....	7
2.7.2 Tomografia Computerizată - CT.....	7
2.7.3 PET-CT.....	7
2.7.4 Rezonanța magnetică (RMN sau IRM) .....	7
2.7.5 ERCP- colangiopancreatografia endoscopică retrogradă.....	7
2.7.6 Eco-Endoscopie .....	7
<b>3. PARTE SPECIALĂ - STUDIUL UTILIZĂRII DETECȚIEI ELECTROCHIMICE PRIN SENZOR STOCASTIC.....</b>	<b>8</b>
3.1. Detecția CA 19-9 .....	8
3.1.1 Experimental .....	8
3.1.1.1 Reactivi și materiale.....	8
3.1.1.2 Aparatura utilizată .....	8
3.1.1.3 Principiul metodei.....	9
3.2. Detecția CEA .....	9
3.2.1. Experimental .....	9
3.3. Detecția Her-1.....	10
3.3.1 Experimental .....	10
<b>4. ANALIZĂ LOT PACIENȚI - PARTE SPECIALĂ.....</b>	<b>11</b>



4.1.	<i>Motivația studiului</i> .....	11
4.2.	<i>Organizarea cercetării</i> .....	11
4.2.1	Scopul studiului .....	11
4.2.2	Tipul cercetării .....	12
4.3.	<i>Obiective</i> .....	12
<b>5.</b>	<b>EȘANTIOANELE DE SUBIECȚI ÎN VEDEREA CERCETĂRII</b> .....	<b>12</b>
<b>6.</b>	<b>MATERIAL ȘI METODĂ</b> .....	<b>13</b>
6.1.	<i>Managementul De Diagnostic În Cancerul De Pancreas</i> .....	13
6.2.	<i>Studiul Utilizării Detecției Electrochimice Prin Senzor Stochastic</i> .....	14
6.3.	<i>Studiul Utilizării Detecției Prin Imunohistochimie</i> .....	15
6.4.	<i>Implicații Clinice Ale Determinării Markerilor Tumoralii Prin Senzori Stocastici În Cancerul De Pancreas</i> .....	16
6.4.1	Screeningul populației cu factori de risc.....	16
6.4.2	Investigații imagistice .....	16
6.4.3	Examenul histopatologic .....	16
6.4.4	Rolul și locul chirurgiei în cancerul de pancreas .....	16
6.4.5	Diagnostic personalizat .....	16
6.4.6	Tratament personalizat prin testarea markerilor tumoralii pe senzor stochastic ....	16
6.4.7	Creșterea speranței de viață .....	16
6.4.8	Costuri reduse pentru determinările pe senzor .....	16
<b>7.</b>	<b>METODE STATISTICE DE CERCETARE UTILIZATE</b> .....	<b>16</b>
7.1.	<i>Premizele Cercetării</i> .....	16
7.2.	<i>Statisticile Descriptive</i> .....	17
7.3.	<i>Testarea Semnificației și Testele Inferențiale De Bază</i> .....	17
7.4.	<i>Analiza seriilor de variație</i> .....	17
<b>8.</b>	<b>REZULTATELE OBȚINUTE ÎN CADRUL STUDIULUI</b> .....	<b>17</b>
8.1.	<i>Parametri Clinici Și Epidemiologici</i> .....	17
8.2.	<i>Comorbidități (boli asociate)</i> .....	19
8.3.	<i>Parametri histopatologici</i> .....	19
8.3.1	Diagnostic histopatologic.....	19
8.3.2	Grading tumoral ADK pancreas .....	20
8.3.3	Analiză IHC .....	20



8.4.	<i>Diagnostic pe senzori stocastici</i> .....	21
8.4.1	Testare CEA pe senzori .....	21
8.4.2	Testare CA 19-9 pe senzori .....	22
8.4.3	Testare HER-1 pe senzori.....	22
8.5.	<i>Diagnostic biochimic pe testarea ELISA</i> .....	22
8.5.1	Testare CA19-9 prin tehnica ELISA .....	22
8.5.2	Testare CEA prin tehnica ELISA.....	23
8.6.	<i>Testare comparativă ELISA/imunohistochimie/senzor</i> .....	23
8.6.1	Testarea CA 19-9 comparativă ELISA/imunohistochimie/senzor .....	23
8.6.2	Testarea CEA comparativă ELISA/imunohistochimie/senzor .....	23
8.6.3	Testarea HER-1 comparativă imunohistochimie/senzor .....	24
8.7.	<i>Analiza datelor de supraviețuire</i> .....	24
8.7.1	Dispersia metastazelor pe grupe de vârstă.....	24
8.7.2	Dispersia pacienților decedați pe grupe de vârstă .....	24
<b>9.</b>	<b>ANALIZA ECONOMICĂ A COSTURILOR DE DIAGNOSTICARE</b> .....	<b>24</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUZII</b> .....	<b>25</b>
10.1	<i>Concluzii</i> .....	25
10.2	<i>Contribuții proprii</i> .....	28



## 1. INTRODUCERE

### 1.1. Context

Cancerul de pancreas este o afecțiune foarte agresivă, cu o supraviețuire globală la 5 ani de aproximativ 5%, care este diagnosticată în stadii avansate de boală și cu opțiuni terapeutice limitate.

Scopul acestui studiu a fost de a evalua comparativ nivelul mai multor markeri tumorali de importanță biologică în vederea detecției precoce a cancerului de pancreas confirmat HP prin IHC din probe biologice – țesut, sânge și alte fluide biologice, și începerea timpurie a unui tratament eficient. Între markerii selectați se regăsesc CA19-9, CEA și HER-1 din ser și CA 19-9, CEA și HER-1 din țesutul pancreatic tumoral. Tehnicile de detecție utilizate au fost: testul ELISA și analiza electrochimică prin senzori stochastici din ser, respectiv de pancreas integral și determinările imunohistochimice de CA 19-9, CEA și HER-1 din țesut tumoral.

S-au recoltat probe biologice sangvine tuturor pacienților din eșantionul de studiu, pentru testarea de CA 19-9, CEA și HER-1 electrochimică pe senzor stochastic și testare prin tehnica ELISA, dar și prin analiza IHC din puncție-biopsie intraoperatorie sau biopsie intraoperatorie excizională / excizie tumorală.

## 2. PARTEA GENERALĂ

### 2.1. Aspecte Generale Ale Managementului Cancerului De Pancreas

Ghidurile The American Cancer Society pentru managementul de diagnostic al Cancerului de Pancreas - SHORT: KEY RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE cuprind următoarele recomandări clinice:

Clasificarea evidenței pacienților:

A = Dovezi consistente, de bună calitate, orientate către pacienți;

B = dovezi inconsecvente sau cu o calitate redusă a pacientului;

C = consens, dovezi orientate spre boli, practici obișnuite, opinii ale experților sau serii de cazuri.

### 2.2. Epidemiologia și factorii de risc

Cancerul pancreatic este o boală a adulților în vârstă, majoritatea cazurilor aparând la pacienții cu vârsta între 60 și 80 de ani.



Cancerul de pancreas este o caracteristică a mai multor sindroame genetice, care sunt reprezentate de câteva cazuri de cancer familial, cum ar fi: Cancer pancreatic familial (monoalelic); ataxia-teleangiectasia (biallelic) ATM 11, cancer pancreatic familial PALB2, Cancer colorectal non-polipoză ereditară (sindromul Lynch), Pancreatită ereditară PRSS1, Sindromul Peutz-Jeghers STK11, Sindromul melanomului multiplu atipic familial CDKN2A, cancer de pancreas și ovarian familial cu BRCA2.

### **2.3. Patogenia Tumorilor pancreatice**

Cancerul de pancreas constituie un set eterogen de boli care includ cancerele pancreasului endocrin și ale pancreasului exocrin. Conform studiilor genetice actuale acest tip de cancer se dezvoltă dintr-una din cele trei leziuni precursoare cunoscute - neoplaziile intraepiteliale pancreatice (PanIN), neoplazmele papiliare mucinoase intraductale și neoplazmele chisturilor mucinoase.

Cele mai cunoscute gene care au fost studiate pentru patogenia cancerului de pancreas, sunt: KRAS2, CDKN2A, TP53, SMAD4, ARID1A, MLL3, GNAS, RNF43.

În acest moment, identificarea unui test de screening precis, cu costuri reduse pentru diagnosticarea precoce a cancerului de pancreas în practica clinică rămâne o necesitate importantă nerealizată.

### **2.4. Markeri Moleculari De Predicție În Cancerul De Pancreas**

#### ***2.4.1 Antigenul Carbohidrat CA 19-9***

CA 19-9 (antigenul carbohidrat 19-9), numit de asemenea antigenul cancer 19-9 sau antigenul Lewis Sialyl este un marker tumoral utilizat în primul rând pentru detecția cancerului pancreatic. CA 19-9 este un antigen definit prin legarea anticorpului monoclonal de suprafața markerului tumoral Sialyl-Lewis A, exprimată pe suprafața celulelor canceroase ca glicolipid și ca o glicoproteină.

Conform studiilor de specialitate în domeniul cancerului de pancreas CA 19-9 a rămas predictorul semnificativ al detecției, monitorizării evoluției și a recurenței timpurii a acestei boli.<sup>41</sup>

#### ***2.4.2 Atigenul Carcinoembrionar - CEA***



Antigenul carcinoembrionar - CEA este cel de-al doilea biomarker seric utilizat cel mai frecvent pentru a detecta cancerul de pancreas (CP). Există mult mai puțină literatură științifică ce evaluează impactul prognostic al CEA comparativ cu CA 19-9. Cu toate acestea, nivelurile crescute de CEA au fost stabilite ca un predictor independent al supraviețuirii scăzute.

### **2.4.3 Her-1 - Human epidermical receptor**

HER-1 reprezintă proteina găsită pe suprafața unor celule la care se leagă factorul de creștere epidermal, determinând divizarea celulelor. Acesta se găsește la niveluri anormal de mari pe suprafața multor tipuri de celule canceroase, astfel încât aceste celule se pot diviza excesiv în prezența factorului de creștere epidermal. Mai este cunoscut și sub numele de EGFR, receptorul factorului de creștere epidermal sau ErbB1<sup>46</sup>.

Constatările cu privire la semnificația prognostică a expresiei proteinei HER-1 au fost inconsecvente pentru acest tip de pacienți. S-a constatat că exprimarea HER-1 în cancerul pancreatic raportată ca fiind de 30,4%, este considerată un marker de agresivitate tumorală, iar pacienții prezintă o scădere a gradului de supraviețuire.

## **2.5. Diagnosticul Histopatologic**

Diagnosticul histopatologic (HP) reprezintă la ora actuală cea mai sigură metodă de diagnostic a cancerului de pancreas. Pentru o diagnosticare de înaltă specificitate, (HP) se completează cu diagnosticul imunohistochimic. Circa 95% dintre tumorile pancreatice apar în porțiunea exocrină și se pot dezvolta din epiteliul ductal și celulele acinare, sau țesut conjunctiv. Doar 2% din tumorile pancreasului exocrin sunt benigne. Cel mai frecvent cancer pancreatic este adenocarcinomul, care reprezintă aproximativ 80% din totalul tipurilor de cancer pancreatic.

Conform ESMO - sunt foarte cunoscute următoarele subtipuri histologice de cancer pancreatic: 90% reprezintă adenocarcinomul ductal infiltrativ, 10% este reprezentat de carcinomul cu celule acinare, neoplasm intraductal papilar mucinos, cystadenocarcinom mucinos și pancreatoblastomul (întâlnit la copii).



## **2.6. Diagnostic Imunohistochimic - IHC**

Realizarea tehnicii de imunohistochimie are ca scop stabilirea unui diagnostic molecular personalizat în vederea aplicării unui tratament personalizat cu scopul creșterii speranței de viață în rândul pacienților cu cancer de pancreas.

### ***2.6.1 Clasificare moleculară a subtipurilor biologice***

Cei mai studiați markeri tumorali pancreatici prin IHC, așa cum reiese din literatura științifică de specialitate, sunt: CAM 5.2, CK7, CK20, CK17, CK19, MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC6, p53, DPC4 / SMAD4, tip homeobox 2 de tip caudal CDX2, pVHL, S100P, IMP3, maspin, mezotelin, claudin 4, claudin 18, anexin A8, fascinina, PSCA, EPCAM, CEA și CA19-9, HER-1, HER-2, HER-3, HER-4.

Pentru diagnosticul imunohistochimic al ADK pancreatic este necesară probă biologică de diagnostic (eșantion de rezecție sau biopsie), un bloc reprezentativ colorat cu hematoxilina-eozina, care a fost selectată pentru examinarea imunohistochimică. Acesta se colorează cu un panou specific care trebuie să conțină minim 38 de anticorpi, așa cum reiese din literatura de specialitate.<sup>53</sup>

Imunoreactivitatea este examinată cantitativ prin examinarea vizuală a întregii secțiuni și înregistrată utilizând un scor numeric continuu (de la 1 până la 100) pe baza procentului de celule tumorale intens colorate. Intensitatea colorării – puternic, moderată, este luată în considerare pentru pozitivitate.

## **2.7. Diagnostic Imagistic**

Pentru diagnosticul imagistic al tumorilor pancreatice sunt utilizate următoarele examinări:

### ***2.7.1 Examinarea cu ultrasunete la nivel abdominal (ecografia transabdominală)***

### ***2.7.2 Tomografia Computerizată - CT***

### ***2.7.3 PET-CT***

### ***2.7.4 Rezonanța magnetică (RMN sau IRM)***

### ***2.7.5 ERCP- colangiopancreatografia endoscopică retrogradă***

### ***2.7.6 Eco-Endoscopie***





### 3. PARTE SPECIALĂ - STUDIUL UTILIZĂRII DETECȚIEI ELECTROCHIMICE PRIN SENZOR STOCASTIC

În studiul de față au fost utilizați următorii senzori stochastici, care au la bază tehnici de funcționare electrochimică, prin utilizarea modurilor stochastice și potențimetrice de enantioanaliză. Acești senzori au fost utilizați pentru analiza markerilor tumorali - CA 19-9, CEA și HER-1 în probele de sânge integral.

#### 3.1. Detecția CA 19-9

Principiul analizei electrochimice sangvine utilizată pentru detecția CA 19-9 la pacienții suspecți sau diagnosticați cu cancer de pancreas are la bază senzorii stochastici. Acești senzori electrochimici enantioselectivi sunt realizați pe bază de pastă de diamant și pastă de carbon monocristalină care funcționează pe modurile stochastice și potențimetrice de enantioanaliză a fucozelor în fluidele biologice. Au fost utilizate Porfirinele și surfactanții polimerici ca modificatori pentru pastele de diamant și carbon în proiectarea senzorilor. Senzorii stochastici au reușit determinarea simultană a L- și D - fucoză în probele de sânge integral (prin tehnici calitative și cantitative).

#### 3.1.1 *Experimental*

##### 3.1.1.1 *Reactivi și materiale*

Pentru realizarea acestui studiu a fost necesară achiziționarea de la Sigma-Aldrich a L- și D-fucoză, glucoză, CEA, CA19-9, pulberea de grafit, pulbere de diamant monocristalin (1  $\mu$ m, sintetic), Zn-5,10,15,20 tetra (4-sulfofenil) porfirină (ZnTSPP) din care a fost sintetizat 5,10,15,20-tetra (4-sulfofenil) porfirină (TSPP) în Laboratorul de cercetare Patlab București. Surfactanții polimerici - **SUV** (polizodiu N-undecanoil-L-vanilat) și **SULV** (polisodiu N-undecanoil-L-lencilnilat) au fost furnizați de Aldrich. Uleiul de parafină a fost furnizat de Fluka.

Soluțiile au fost preparate din soluții standard de L- și D-fucoză ( $10^{-3}$  ~  $2 \times 10^{-2}$  mol / l), prin metoda diluției în serie. Toate soluțiile au fost preparate proaspete înainte de măsurători. Valoarea pH-ului de lucru a fost calculat corespunzător cu valoarea pKa a fucozei (pKa = 11,3, pentru o concentrație de  $10^{-3}$  mol / l fucoză), astfel încât să se obțină valoarea de 7,1, pentru ca L-fucoza iar D-fucoza să fie într-o stare ionică în soluție.

##### 3.1.1.2 *Aparatura utilizată*

În vederea realizării experimentului a fost necesară folosirea unui potențostat / galvanostat PGSTAT 12 (Eco Chemie, Utrecht, Olanda), versiunea software 4.9 și a sistemului de multiplexoare pentru toate măsurătorile potențimetrice și stochastice. A



fost necesar agregatul de referință Ag / AgCl, cu joncțiune dublă, SGJ, Metrohm, care a servit ca electrod de referință în celulă.

### **3.1.1.3 Principiul metodei**

În scopul realizării experimentului a fost necesar ca uleiul de parafină și pulberea de grafit să fie amestecate într-un raport de 1: 4 (g / w), urmată apoi de adăugarea soluției pentru material electroactiv ( $10^{-3}$  mol / l în apă). 100 l de la fiecare material electroactiv soluție la 200 mg pastă de carbon. Pasta modificată a fost plasată într-un tub de plastic. Diametrul suprafeței active din microsensori a fost de 300  $\mu$ m. A fost obținut un contact electric prin introducerea unui fir Ag / AgCl. Suprafața microsensorului a fost lustruită cu hârtie de alumina (benzi de lustruit 30144-001, Orion) înainte de utilizare. Când nu se utilizează, toți microsenzorii sunt stocați într-un mediu uscată la temperatura camerei.<sup>79</sup>

În concluzie, pentru detecția CA 19-9 s-a folosit un sistem multiplex conectat la PGSTAT, care a fost utilizat pentru analiza L- și D-fucozelor în probele de sânge integral. Senzorii stochastici și microsenzorii potențiometrice au fost conectați și, secvențial, probele au fost mai întâi analizate utilizând microsenzorii stochastici pentru a determina care enantiomeri sunt prezenți în fluidul biologic și în ce cantitate, și apoi au fost utilizați microsenzorii potențiometrice pentru a dubla analiza cantitativă.

În consecință, analiza calitativă a fost efectuată pe baza semnăturii de L- și D-fucoză ( $t_{off}$ ) găsită prin analiza diagramelor obținute pentru probele de sânge integral.

## **3.2. Detecția CEA**

Pentru analiza antigenului carcinoembrionar (CEA), au fost realizați senzori potențiometrice pe bază de paste de grafit și grafene modificate cu 5,10,15,20-tetrafenil-21H, 23H porfirin (P). Limitele de cuantificare pentru CEA a fost de  $1,6 \times 10^{-11}$  mg / ml utilizând senzorul bazat pe P / Graphite și  $1,6 \times 10^{-6}$  mg / mL folosind senzorul bazat pe P / Grafen. Senzorii au fost testați pentru detecția CEA prin analiză în probele de sânge integral.<sup>80</sup>

### **3.2.1. Experimental**

#### **3.2.1.1 Reactivi și materiale folosite**

S-a utilizat mostră de antigen carcinoembrionar (CEA), praf de grafen, pulbere de grafit și 5,10,15,20-tetrapenil-21H, 23H-porfirina (P), fosfat monosodic și fosfat disodic care au fost achiziționate de la Sigma Aldrich (Milwaukee, USA), uleiul de parafină și NaN<sub>3</sub> care au fost achiziționate de la Fluka (Buchs, Elveția). Fosfatul monosodic și fosfatul disodic au fost utilizate pentru prepararea soluției tampon fosfat 0,1 mol / l, pH = 7,4. Apa deionizată



utilizată pentru pregătirea tuturor soluțiilor a fost obținută de la un aparat Millipore Sistemul Direct-Q 3 (Molsheim, Franța). Toate soluțiile standard au fost preparate în soluție tampon  $\text{pH} = 7,4$ , cu  $\text{NaN}_3$  0,1% într-un raport apă: soluție tampon 1: 1 (v / v). Tehnica diluției seriate a fost utilizată pentru prepararea soluțiilor standard de concentrații diferite. Toate soluțiile au fost preparate proaspăt înainte de măsurători.<sup>80</sup>

#### 3.2.1.2 Aparatura utilizată

Aparatul folosit pentru acest tip de senzor este un potențostat / galvanostat Ivium. A fost realizat un electrod de Ag / AgCl (0,1 mol / l KCl) care a servit ca electrod de referință în celulă.<sup>80</sup>

#### 3.2.1.3 Principiul metodei

Designul senzorului a fost realizat astfel: pasta de grafit și pasta de grafit modificată au fost preparate conform descrierilor din lucrare. Caracteristicile răspunsului (determinare, sensibilitate, selectivitate) arată că senzorul poate fi utilizat pentru analiza CEA în fluide biologice. Prin urmare, s-a folosit senzorul propus pentru analiza CEA în probele de sânge integral. Senzorul propus a prezentat caracteristici de răspuns bune și fiabile pentru analiza antigenului carcinoembrionar.

### 3.3. Detecția Her-1

Identificarea moleculară a HER-1 din probele de sânge integral s-a realizat prin tehnica stohastică care a fost urmată de cuantificarea stohastică și prin voltametrie a impulsurilor diferențiale. Testele de detecție au fost efectuate utilizând probe de sânge integral, care au dovedit că platformele pot fi utilizate pentru identificarea și cuantificarea HER-1 cu sensibilitate ridicată și fiabilitate.<sup>81</sup>

#### 3.3.1 Experimental

##### 3.3.1.1 Reactivi și materiale folosite

Mostră de HER-1 (receptor EGF), pulbere de diamante naturală (DP) care are a dimensiunea particulelor de 1  $\mu\text{m}$  (99,9%), maltodextrină (MD) (echivalent de dextroză 4-7), fullerenul Mn (III) P, C60, pulberea de grafit și tetrahidrofuranul (THF) au fost achiziționate de la Aldrich (Milwaukee, USA). Uleiul de parafină a fost achiziționat de la Fluka (Buchs, Elveția). Tampon Titrisol soluție ( $\text{pH} = 7,4$ ) a fost achiziționată de la Merck. Apă deionizată a fost obținută dintr-un sistem Millipore Direct-Q 3 (Molsheim, Franța) care a fost folosită pentru prepararea tuturor soluțiilor. Toate soluțiile standard au fost tamponate la  $\text{pH} = 7,4$  cu tampon fiziologic (tampon fosfat salin,  $\text{pH} = 7,4$ ).



### 3.3.1.2 Aparatura utilizată

Aparatura cu care au fost efectuate analizele de sânge au fost: un potențostat / galvanostat PGSTAT 12 conectat la o celulă cu trei electrozi și conectat la un computer prin intermediul unui Eco Chemie (Utretch, Olanda) versiunea software 4.9. Măsurătorile de pH au fost efectuate cu ajutorul unui multiparametru CyberScan PCD 6500.

### 3.3.1.3 Principiul metodei

Tehnica stohastică este o tehnică cronoamperometrică utilizată pentru măsurătorile de  $t_{on}$  și  $t_{off}$  la 125 mV. Platforma s-a scufundat în soluții conținând analitul în diferite concentrații. Concentrațiile determinate din probele de sânge recoltate de la pacienții diagnosticați cu cancer de pancreas, au fost prelucrate în vederea depistării HER-1 utilizând ecuațiile de calibrare bazate pe valorile de ton înregistrate, în timp ce valorile de  $t_{off}$  au fost utilizate ca marcă a HER-1 inițială.<sup>81</sup>

Ca și concluzie, această tehnică poate fi un test de screening molecular pentru detecția HER-1 în probele de sângele întregal. Timp de răspuns foarte scurt (5-20 minute).

## 4. ANALIZĂ LOT PACIENȚI - PARTE SPECIALĂ

### 4.1. Motivația studiului

Impactul metodelor moderne de analiză în managementul cancerului de pancreas constituie motivația prezentului studiu.

### 4.2. Organizarea cercetării

#### 4.2.1 Scopul studiului

Scopul lucrării de față este de a prezenta aspecte ale diagnosticului molecular rapid cu rol de screening în populația cu risc crescut pentru cancerul de pancreas prin detecția rapidă de markeri tumorali din fluide biologice, în studiul de față – CA19-9, CEA, HER-1 și cu ajutorul senzorilor stocastici, preoperator și compararea rezultatelor de CA19-9, CEA, HER-1 depistate în sânge prin determinări biochimice-ELISA și de imunohistochimie, postoperator, din țesutul tumoral la pacienții luați în studiu.

Avantajele depistării precoce a cancerului de pancreas cu ajutorul senzorilor stocastici, confirmat prin testare ELISA și IHC, sunt:

- Stabilirea precoce a unui diagnostic personalizat în scopul fixării unei scheme de tratament personalizat cu rolul creșterii speranței de viață în rândul pacienților cu cancer pancreatic;



- urmărirea post-terapeutică a pacienților prin analiza de markeri tumorali, cu ajutorul senzorilor stocastici;
- urmărirea recidivelor și a evoluției bolii;
- cheltuieli minime conform analizei economice a costurilor.

Finalitatea acestei cercetări este realizată prin publicarea unor articole științifice cu impact în lumea medicală, crearea unor premize în vederea omologării metodei de analiză rapidă a markerilor tumorali prin utilizarea senzorilor stocastici, realizarea unui program de screening populațional în vederea depistării precoce a cancerului de pancreas și implicit a creșterii speranței de viață a pacienților diagnosticați timpuriu cu această afecțiune.

#### **4.2.2 Tipul cercetării**

Studiul de față are caracter de cercetare aplicativă și de dezvoltare a activității practice de diagnostic molecular rapid, prin care se utilizează o metodă de depistare precoce a tumorilor de pancreas pentru determinarea de markeri tumorali la pacienții cu tumori de pancreas.

#### **4.3. Obiective**

- Ne dorim ca rezultatele acestui studiu să ducă la emiterea de ipoteze privind testarea rapidă, cu rol de screening a populației, în special, în vederea depistării precoce a cancerului de pancreas prin folosirea senzorilor stocastici, ipoteze care pot fi testate și demonstrate prin studii analitice.
- Un alt obiectiv al acestui studiu este de a se determina prezența CA19-9, CEA, HER-1 în fluidele biologice preterapeutic, când aceștia prezintă un nivel maxim, și urmărirea eficienței terapeutice prin determinări ale CA19-9, CEA, HER-1.
- Un alt obiectiv al acestui studiu este acela de a găsi o metoda de diagnostic molecular rapid, ieftină și eficientă, care să intre în analizele uzuale ale pacienților cu cancer de pancreas, în special pentru screening, în vederea depistării precoce și a creșterii speranței lor de viață.

### **5. EȘANTIOANELE DE SUBIECȚI ÎN VEDEREA CERCETĂRII**

În studiul pilot de față s-a constituit un eșantion format din 36 subiecți, care au fost internați în Clinica Chirurgie 4 SUUB, în perioada 2013 - 2017. cu vârste cuprinse între 38 și 91 de ani, din care 15 bărbați și 21 femei, conform datelor prezentate în tabelul V.1.



## 6. MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul se bazează pe analiza retrospectivă a documentelor primare (fișe de ambulator, foi de observație și protocoale de operație) în concordanță cu stadiul bolii și tipul intervenției chirurgicale (radicale/ paleative) pentru CP în rândul celor 36 pacienți tratați în cadrul SUUB în perioada anilor 2013-2017, conform Tabel 2.

### 6.1. Managementul De Diagnostic În Cancerul De Pancreas

În ciuda progreselor tratamentului (chirurgie extinsă și chimioradioterapie) a cancerului pancreatic diagnosticat, prognosticul este încă foarte slab, cu o supraviețuire la 5 ani mai mică de 5%. Prognosticul atât de redus al cancerului pancreatic poate fi explicat prin diagnosticarea tardivă (boala avansată sau diseminată local) și biologia agresivă a tumorii, cu un răspuns scăzut la terapia curentă. Acest tip de cancer este extrem de dificil de diagnosticat în stadiul incipient din cauza puținelor simptome și a localizării anatomice a pancreasului, ceea ce îl face inaccesibil examenelor clinice și metodelor de diagnostic de rutină. În consecință, este nevoie de un test de screening sensibil și foarte specific pentru diagnosticarea precoce a cancerului pancreatic la pacienții predispuși la cancer pancreatic și, în general, la pacienți asimptomatici (screening în masă) pentru a reduce rata diagnosticului cancerului.

Scopul Studiului pilot este de a testa noi instrumente bazate pe nanomateriale inovatoare pentru teste de screening rapid, ieftine și fiabile pentru diagnosticarea CP în stadiu avansat de boală și implicit reducerea mortalității pe baza unor noi tehnici de screening și a diagnosticului precoce. Biomarkerii, care au dovedit că testele clinice anterioare sunt relevante pentru cancerul pancreatic, cum ar fi CA19-9, CEA și HER-1, sunt analizați în diferite fluide biologice cum ar fi sânge întreg, ser, saliva, urină, suc de pancreas și lacrimi folosind noii senzori dezvoltati. Testele de screening sunt validate pe baza metodelor standard de analiză a biomarkerilor propuși, utilizând probe biologice luate de la pacienți cu diagnostic de CP, confirmat.

Studiul vizează utilizarea senzorilor electrochimici și optici și / sau biosenzorilor bazați pe nanomateriale și / sau materiale nanostructurate, care pot fi utilizate pentru screening-ul testelor de fluide biologice pentru cancerul pancreatic. Succesul studiului este asigurat prin selectarea celor mai bune materiale utilizate pentru proiectarea senzorilor; selectarea tipului și naturii biomarkerilor responsabili de diagnosticul cancerului pancreatic; validarea testului de screening și începerea procesului de omologare a metodei de diagnosticare a acestei boli pancreatice.



Practic, numeroși senzori electrochimici sunt proiectați pe bază de nanomaterialelor și materialelor nanostructurate ca instrumente noi pentru testele de screening. Pentru senzorii electrochimici se folosesc ca metode de lucru **metoda stochastică** - care este singura tehnică electrochimică capabilă să efectueze atât analize calitative cât și cantitative fiabile ale markerilor, aceiași senzori putând fi utilizați cu diferite spectre amperometrice și optice (SPR și fluorescență) pentru cuantificarea în continuare a biomarkerilor identificați. De îndată ce semnătura biomarkerului se găsește în diagrama colectată utilizând senzori stochastici, biomarkerul este cuantificat utilizând cel puțin 3 tehnici.

În mai puțin de 40 de minute, se poate raporta care biomarkeri s-au găsit în lichidul biologic și în ce cantități.

## **6.2. Studiul Utilizării Detecției Electrochimice Prin Senzor Stochastic**

În cadrul acestui studiu au fost folosiți senzori stochastici multimod pentru detecție rapidă. Senzorii stochastici reprezintă instrumente noi de detecție rapidă a markerilor tumorali prin metode de electrochimie. Structura lor este realizată pe bază de inginerie a microsferelor nanoporoase pentru detectări stochastice. Microsferele nanoporoase au fost proiectate și folosite ca materiale noi pentru fabricarea de microsenzori stochastici.

Primul model analizat a fost antigenul carcinoembrionar (CEA), utilizat ca model analit pentru a demonstra capacitățile noului material de detectare stochastică. Reprezintă un senzor nou, bazat pe particule de aur și a fost utilizat pentru analiza cantitativă a antigenelor carcinoembrionare în fluide biologice (sânge, salivă, lichid peritoneal).

*Intervalul de concentrații* pentru lucru al Microsenzorului stochastic este de la 1.6108 la 1.6105 mg/ mL) iar pentru sensibilitate este de la 3.0 la 103 s /mg /ml.

*Limita de cuantificare* (16 ng / ml) a făcut posibilă utilizarea sa cu încredere pentru testele de screening în probe de sânge integral cu scopul detecției antigenelor carcinoembrionare.

Această tehnică de analiză reprezintă o alternativă pentru tehnica ELISA, metodă care a fost dezvoltată de grupul de cercetatori condus de D-na Profesor Raluca-Ioana van Staden de la Institutul Național de Cercetare pentru Electrochimie și Materie Condensată. Acordul de cooperare stabilit între Laboratorul de Electrochimie, PATLAB al INCEMC și Catedra Chirurgie 4 SUUB, a făcut posibilă validarea noii metode pentru determinarea rapidă și fiabilă a panelului de biomarkeri format din: CA19-9, CEA, HER-1.

Pentru acest tip de analiză este necesară recoltarea a cca 1 ml sânge, sau alte fluide biologice (salivă, lichid pleural, lichid peritoneal, urina) de la subiectul analizat.



Noile instrumente sunt senzori de mărimea unui vârf de ac, bazați pe pastă de diamant, de aur, modificată cu materiale nanostructurate cum ar fi: maltodextrine, chitosan, oleamide.

Principiul de funcționare al acestor senzori este bazat pe conductivitatea unor canale aflate în membranele acestora.

În prima etapă, biomarkerii blochează canalul făcând ca intensitatea curentului să devină zero – timpul cât canalul este blocat fiind specific fiecărui analit și se numește semnătura analitului ( $t_{off}$ ).

A doua etapă, are loc în canal - biomarkerul se leagă de peretele canalului favorizând producerea proceselor redox; timpul petrecut pentru aceste procese se notează cu  $t_{on}$  și este folosit pentru determinarea cantitativă a biomarkerului; concentrația biomarkerului este invers proporțională cu valoarea  $t_{on}$ .

Avantajele utilizării unor astfel de senzori pentru determinarea de biomarkeri tumorali sunt:

- costul foarte redus (aproximativ 20 lei pentru cei trei biomarkeri / analiză);
- posibilitatea determinării celor trei simultan în proba de sânge, așa cum a fost prelevată de la pacient;
- timpul de analiză este scurt – 20 de minute maximum, pentru panelul de biomarkeri;
- sensibilitatea metodei permite determinarea lor în concentrații foarte mici și implicit detecția timpurie a cancerului de pancreas;
- metoda este fiabilă, reproductibilă (valorile obținute pentru testele de validare fiind de peste 95.00%, cu o deviație relativă standard mai mica decât 1.00%, când măsurătorile s-au efectuat din proba de sânge).

Rezultatele obținute utilizând senzorii stocastici au fost comparate cu cele obținute prin metodele clasice de analiză – și s-a constatat o bună corelație.

O astfel de metodă este foarte eficientă pentru depistarea cancerului de pancreas, în stadiul în care pacientul nu este încă bolnav clinic.

### **6.3. Studiul Utilizării Detecției Prin Imunohistochimie**

Materialul cercetat în acest studiu a fost reprezentat de țesutul tumorilor pancreatice. Piese de excizie chirurgicală și/sau de biopsie au fost fixate în formol și prelucrate inițial prin tehnici uzuale de includere la parafină, fiind aduse până la stadiul de bloc de parafină, în cadrul laboratorului de anatomie patologică al SUUB, apoi pacienții au fost îndrumați către laboratorul de imunohistochimie, din cadrul Institutului Victor Babeș și Oncoteam. În aceste două centre de elită în domeniu s-a realizat prelucrarea imunohistochimică a probelor.





Tehnica de lucru - Principiu:

Tehnicile de imunohistochimie au la bază reacția antigen-anticorp, antigenul urmărit aflându-se în materialul biptic, iar anticorpii utilizați în scopul evidențierii acestora sunt comercializați sub diverse forme:

- mono - sau poli - clonali,
- concentrați sau diluați.

Situsul legării cu anticorpurile poate fi identificat fie prin legarea directă a antigenului de un anticorp marcat, fie printr-o metodă indirectă de legare, prin intermediul unui lanț de alte reacții, cu anticorpi secundari, marcați prin reacție indirectă, în 2 sau mai multe faze. Timpul necesar prelucrării unui țesut este de cca 10-30 de zile, până la citirea rezultatelor finale de certitudine.

#### **6.4. Implicații Clinice Ale Determinării Markerilor Tumoralii Prin Senzori Stocastici În Cancerul De Pancreas**

În acest subcapitol au fost prezentate următoarele probleme:

*6.4.1 Screeningul populației cu factori de risc*

*6.4.2 Investigații imagistice*

*6.4.3 Examenul histopatologic*

*6.4.4 Rolul și locul chirurgiei în cancerul de pancreas*

*6.4.5 Diagnostic personalizat*

*6.4.6 Tratament personalizat prin testarea markerilor tumoralii pe senzori stocastici*

*6.4.7 Creșterea speranței de viață*

*6.4.8 Costuri reduse pentru determinările pe senzori*

### **7. METODE STATISTICE DE CERCETARE UTILIZATE**

#### **7.1. Premizele Cercetării**

Precizarea premiselor cercetării determină în biostatistică creșterea încrederii în concluziile studiului. Dat fiind aceste aspecte generale, în cercetarea de față s-au avut în vedere următoarele premise:

- conform statisticilor oficiale, CP rămâne o cauză importantă de deces, locul 4, în România;



- cele mai multe cazuri au fost depistate în stadiu avansat de boală, cei mai mulți pacienți se prezintă la consultație în stadiu IV de boală;
- incidența maximă a CP se înregistrează în jurul vârstei de 65-92 de ani;

## **7.2. Statisticile Descriptive**

Au fost efectuate cu scopul de a descrie cât mai exact fenomenele urmărite în cadrul studiului.

## **7.3. Testarea Semnificației și Testele Inferențiale De Bază**

În cadrul acestui studiu au fost utilizate ca metode de lucru Eroarea standard și Intervalele de încredere.

## **7.4. Analiza seriilor de variație**

Rezultatele cercetării, exprimate prin date cantitative, obținute ca urmare a observării sau înregistrării, se înscriu sub forma unui șir de valori ale caracteristicii studiate. Astfel, se obține o serie statistică, numită serie de variație sau de distribuție.

# **8. REZULTATELE OBȚINUTE ÎN CADRUL STUDIULUI**

## **8.1. Parametri Clinici Și Epidemiologici**

Prezentul studiu a fost efectuat pe o perioadă de 5 ani, în cadrul Spitalului Universitar de Urgență București, clinica Chirurgie 4, analizându-se un număr de 36 de cazuri, din care repartiția după gen este de 21 femei și 15 bărbați.

### **➤ Analiză după vârsta pacienților**

Raportat la incidența bolii în rândul populației se poate observa că aceasta respectă trendul indicat în statisticile curente și anume incidența bolii este mai frecventă la grupele de vârstă 65-74 ani (31% din totalul cazurilor studiate)

În statisticile internaționale vârsta medie a pacienților diagnosticați cu cancer de pancreas este de 72 de ani, în timp ce în cazuistica noastră vârsta medie este mult mai mica, 65 de ani, conform graficului din Figura 8.4., se observă o distribuție mai mare a cazurilor la pacienții vârstnici ceea ce se încadrează în trendul statisticilor internaționale.

### **➤ Analiza pacienților pe grupe de vârstă, sex și stadiul bolii**

Deși incidența CP este mai des întâlnită la bărbați, în eșantionul studiat de noi numărul cazurilor de CP la femei este mai mare decât la bărbați. Creșterile anuale păstrează însă trendul crescător la bărbați.



Urmărind corelația grupe de vârstă – gen se observă că la grupa de vârstă 35-44 de ani, în lotul studiat nu există pacienți – de gen feminin. Incidența CP este mai mare la grupa de vârstă 65-74 de ani (7 cazuri la bărbați din 21) iar la femei grupa de vârstă cu cea mai mare incidență a bolii este pe o plajă mai mare de valori, 65-84 de ani.

➤ **Analiza pacienților după diagnostic**

Incidența cea mai mare în lotul de pacienți studiat o are cancerul pancreasului exocrin, cel mai comun tip de cancer al pancreasului, cunoscut și sub numele de adenocarcinom pancreatic (ADK).

➤ **Analiza repartiției pacienților din lotul studiat în funcție de stadializarea tumorii**

Conform datelor prezentate ponderea cea mai mare a depistării cazurilor în stadiul IV de boală este de 70%, ceea ce respectă afirmațiile din literatura internațională de specialitate.

➤ **Analiza repartiției pacienților din lotul studiat în funcție de localizarea tumorii**

Analizând repartizarea pacienților în funcție de localizarea tumorii se constată o incidență mai mare (58%) a pacienților cu localizare a CP în capul pancreasului față de celelalte tipuri.

Coroborând cu stadializarea bolii, la lotul de pacienți studiat se constată că răspândirea și gravitatea CP este mai mare la poziționarea Cap Pancreas, ceea ce respectă trendul statisticilor internaționale.

➤ **Analiza repartiției pacienților din lotul studiat în funcție de tipul intervenției**

Datorită prezentării unui procent ridicat de pacienți în stadiul IV de boală, cu diseminare loco-regională și la distanță, cazurile la care se poate practica intervenție chirurgicală radicală – *duodenopancreatectomie* - DPC sunt foarte puține. În lotul nostru de pacienți au beneficiat un număr de 8 cazuri de duodenopancreatectomie totală și 2 cazuri de *pancreatectomie distală* cu intenție de radicalitate. Celelalte cazuri – 26 de pacienți – adică 72 % au suferit intervenții chirurgicale paliative cu scopul dezobstrucției căilor biliopancreatice și a duodenului.

*ERCP* – ul a fost efectuat la un număr de 12 pacienți, în stadiu IV de boală, cu scopul de a examina gradul de obstrucție a căilor biliopancreatice dar și cu scopul montării unor dispozitive protetice speciale transtumorale, denumite stenturi – rolul lor fiind de a se efectua drenajul intern al lichidelor biliopancreatice și ieșirii pacienților din icter mecanic.

*Derivația internă* – reprezintă o intervenție chirurgicală de stabilire a unei căi de drenaj biliar și a evitării obstrucției căii digestive principale – duodenale, prin anastomoze gastrointestinale de tip ansă exclusă în "Y" sau în "Ω", cu fistulă Brown la piciorul ansei.



## 8.2. Comorbidități (boli asociate)

Din analiza datelor, pacienții din eșantionul cu bolile asociate, rezultă că din totalul pacienților ( 36 ), 33 de pacienți au avut boli asociate alături de ADK și carcinom și numai un pacient nu a fost depistat cu boli asociate. Dacă discutăm în procente, 83% prezintă boli asociate, respectiv 30 cazuri.

Comorbiditățile au fost prezente în 91% din total cazuri și în 94% din cazurile diagnosticate cu ADK și carcinom pancreatic. La unii pacienți au fost prezente mai multe afecțiuni asociate, majoritatea pacienților fiind fumători, obezi, diabetici și hipertensivi.

Se constată că bolile asociate apar după vârsta de 45 de ani, având incidență maximă în intervalul 65-74 de ani.

Se constată că incidența cea mai mare la CP o are HTA (27 de cazuri adică 75% din total cazuri analizate), DZ II (16 cazuri adică 44% din total cazuri studiate), Fumatul (12 de cazuri adică 33% din total cazuri analizate), obezitatea (5 cazuri adică 16% din 36 de cazuri studiate în 5 ani).

## 8.3. Parametri histopatologici

### 8.3.1 *Diagnostic histopatologic*

Examinarea anatomopatologică s-a realizat pe probele biologice de țesut tumoral obținute prin rezecție tumorală în 10 cazuri (8 DPC și 2 pancreatectomii distale) și pe probele de biopsie tumorală de la restul de cazuri. Toate probele de țesut tumoral au fost prelucrate la parafină și examinate în Laboratorul de Anatomie Patologică al Spitalului Universitar de Urgență București.

În eșantionul de 36 de subiecți studiat, 34 au fost diagnosticați cu ADK și carcinom. În tabelul VIII.11 este prezentat numărul de cazuri pe tipuri de tumori decelate. Cazuistica noastră se aliniază la incidența internațională, unde se specifică frecvența crescută pentru ADK pancreatic.

Deși foarte rar, limfomul pancreatic a fost întâlnit în lotul de pacienți într-un singur caz – adică în proporție de 3%. Frecvența tumorilor endocrine pancreatice în literatura internațională de specialitate este scăzută comparativ cu frecvența tumorilor exocrine fapt care reiese și din analiza lotului nostru de pacienți studiați – 3%.

Statistica internațională raportează o frecvență de tumori ale pancreasului exocrin de 95% iar frecvența tumorilor pancreasului endocrin este de 5%. În lotul nostru frecvența tumorilor exocrine a fost de 97% iar un procent de numai 3% a fost reprezentat de tumorile endocrine.



În concluzie, repartiția tumorilor exocrine / endocrine din cazuistica studiului nostru se aliniază la statistica internațională. Cele mai multe cazuri au fost de tip ADK și carcinom au fost identificate la categoriile de vârstă 65 - 85, cu un maxim de 11 cazuri la grupa de vârstă 65-75 de ani. (Tabelul VIII.9)

### **8.3.2 Grading tumoral ADK pancreas**

Din totalul de 31 de cazuri ADK, 7 cazuri au fost caracterizate ca fiind bine diferențiate, 8 cazuri – mediu diferențiate, 8 cazuri au fost slab diferențiate și 8 cazuri - nediferențiate.

Din lotul luat în studiu reiese faptul că 22% dintre pacienți au prezentat un grading tumoral de ADK bine diferențiat, în timp ce restul de 78% au prezentat în proporții egale (26%) tumori mediu diferențiate, slab diferențiate și respectiv nediferențiate.

În cazuistica studiată, ADK a fost identificat la toate categoriile de vârstă. Carcinoamele au fost identificate cu preponderență la pacienți cu vârste cuprinse între 55 și 84 de ani, cu un maxim la categoria 65-74 de ani - 11 cazuri. (Figura 8.21).

### **8.3.3 Analiză IHC**

Având în vedere stabilirea unui diagnostic personalizat pentru pacienții cu cancer de pancreas este necesar diagnosticul IHC pe baza markerilor moleculari care stabilește sensibilitatea anumitor marker pentru tratamentul personalizat pe care îl stabilește medicul oncolog. Din acest motiv studiul de față a avut în vedere analiza markerilor moleculari CEA, CA19-9, HER-1 cu scopul unui studiu comparativ prin analiză ELISA, IHC și pe senzori stochastici, din sânge integral dar și din țesut tumoral.

Timpul necesar efectuării unei analize IHC din țesut tumoral este cuprins între 10 și 30 de zile. Analizale pacienților luați în studiu au fost efectuate în laboratorul de anatomie patologică din SUUB, iar când stocul de reactivi pentru realizarea acestui tip de analiză a fost epuizat, pacienții au fost îndrumați către laboratoarele Institutului Național Victor Babeș și către laboratoarele de analiză Oncoteam.

- **Analiză IHC CA 19-9** – markerul tumoral CA19-9 reprezintă markerul etalon pentru depistarea, evoluția și recidiva cancerului de pancreas, deși este întâlnit în mai multe tumori digestive.

Histograma de mai sus reprezintă transpunerea grafică a markerului tumoral CA 19-9 prezent la lotul de pacienți studiat, în funcție de stadiul bolii. Cu această ocazie se constată că în urma examinării IHC a produselor biologice rezultate în urma exciziei tumorale și a biopsiei, markerul CA 19-9 a fost întâlnit la toți pacienții din stadiile III și IV, iar la pacienții



în stadiul II s-a regăsit la 4 pacienți. Markerul nu a fost depistat IHC în 2 cazuri (1 - stadiul III și 1 - stadiul IV).

- **Analiză IHC CEA** – markerul tumoral CEA prezent, reprezintă prezența unei tumori maligne în organism. CEA în cazul pacienților cu cancer de pancreas trebuie corelat cu prezența CA 19-9.

Histograma de mai sus reprezintă transpunerea grafică a markerului tumoral CEA prezent în lotul de pacienți studiat, în funcție de stadiul bolii. Cu această ocazie se constată că în urma examinării IHC a produselor biologice rezultate în urma exciziei tumorale și a biopsiei, markerul CEA a fost întâlnit la toți pacienții din stadiile II, III și IV. Markerul nu a fost depistat IHC la niciunul din cazuri la pacienții din stadiul I.

- **Analiză IHC HER-1**

Markerul tumoral HER-1 nu este specific tumorilor pancreatice, acesta fiind întâlnit la pacienții cu tumori pulmonare, tumori de sân, tumori tegumentare, ale capului și gâtului, dar și în tumorile gastrointestinale.

Prezența markerului HER-1 este adesea asociată cu o agresivitate tumorală crescută și un prognostic prost al evoluției tumorale. Analiza HER-1 are ca scop sensibilitatea tumorii pancreatice la tratamentul cu Cetuximab (Erbix) și trastuzumab (Herceptin). Acest lucru ajută medicul oncolog în stabilirea unui diagnostic personalizat și administrarea unui tratament personalizat.

Tabelul VIII.16 și Histograma 8.24, de mai sus, reprezintă transpunerea grafică a prezenței markerului tumoral HER-1 în lotul de pacienți studiat, în funcție de stadiul bolii. Cu această ocazie se constată că în urma examinării IHC a produselor biologice rezultate în urma exciziei tumorale și a biopsiei markerul HER-1 a fost întâlnit la 24 pacienții din stadiile II (un caz) și IV (23 de cazuri), iar la pacienții în stadiul I nu s-a regăsit la niciun pacient. Markerul nu a fost depistat IHC în 12 cazuri.

#### **8.4. Diagnostic pe senzori stocastici**

În Anexa 6 sunt prezentate datele privind valorile senzorilor stocastici la pacienții care fac parte din eșantionul de cercetare.

##### **8.4.1 Testare CEA pe senzori**

Prezența CEA pentru testarea pe senzori a fost corelată cu prezența CEA depistată prin analiza ELISA pentru intervalul cuprins între 0-5 ng/ml, dar și prin testarea IHC a CEA prezent în țesut; Valorile patologice prin testarea ELISA sunt considerate cele cu valori mai mari de 5 ng/ml.



În cazul testării CEA cu senzori, din lotul total de 36 de pacienți s-a depistat CEA pozitiv doar 7 cazuri, adică 19%. Din acest eșantion, 4 cazuri, adică 57% au fost depistate negativ (cu valori cuprinse între 0-5 ng/ml) iar 3 cazuri, adică 43% din eșantion au fost depistați pozitiv (cu valori mai mari de 5 ng/ml), după cum reiese din tabelul VIII.17 și graficul din Figura 8.24.

#### **8.4.2 Testare CA 19-9 pe senzori**

Valorile pozitive ale CA 19-9 pentru testarea pe senzori au fost corelate cu prezența CA 19-9 prin testarea ELISA cu valori considerate normale, pentru intervalul cuprins între 0-37 U/ml, dar și cu prezența CA 19-9 prin determinarea IHC pe țesut tumoral; Valorile patologice pentru testarea ELISA sunt considerate cele mai mari de 37 U/ml.

În cazul testării CA 19-9 cu senzori, pe lotul total de pacienți s-a constatat că 31% din eșantion au fost depistați cu valori normale (adică cu valori cuprinse între 0-37 U/ml) iar 69% din eșantion au fost depistați pozitiv (cu valori patologice mai mari de 37 U/ml).

#### **8.4.3 Testare HER-1 pe senzori**

Testarea pe senzor a HER-1 a fost realizată la toți pacienții (36 de cazuri), în toate stadiile de boală, iar în urma testării numai 23 de cazuri au fost depistate pozitiv, marea majoritate fiind în stadiul IV.

### **8.5. Diagnostic biochimic pe testarea ELISA**

Pentru lotul de pacienți luat în studiu s-au realizat testări ELISA pe sînge integral pentru CA 19-9 și CEA.

#### **8.5.1 Testare CA19-9 prin tehnica ELISA**

Testarea CA 19-9 prin tehnica ELISA s-a realizat pentru tot lotul de pacienți, din cei 36 de pacienți luați în studiu numai 25 de cazuri au fost depistate pozitiv pentru CA 19-9 iar 11 cazuri au fost depistate negativ. Un număr de 21 de cazuri s-au aflat în stadiul IV de boală restul fiind: 3 cazuri în stadiul III respectiv un caz în stadiul II de boală.

Din tabelele și graficele care reprezintă analiza CA 19-9 pe total eșantion se constată următoarele:

- Valorile patologice ale CA19-9 cresc proporțional cu creșterea stadiului tumoral, astfel că la Stadiul IV al tumorii se ajunge că toate cazurile testate, sunt cu valori patologice
- Prezența markerului nu este regăsită la Stadiul I
- în proporție de 50% este prezent la Stadiul II.
- În stadiul III de boală au fost depistate pozitiv 3 cazuri din totalul de 7.



### **8.5.2 Testare CEA prin tehnica ELISA**

Testarea CEA prin tehnica ELISA s-a realizat pentru tot lotul de pacienți, din cei 36 de pacienți luați în studiu numai 29 de cazuri au fost depistate pozitiv pentru CEA iar 7 cazuri au fost depistate negativ. Toți pacienții aflați în stadiul IV de boală au fost detectați pozitiv pentru CEA.

### **8.6. Testare comparativă ELISA/immunohistochimie/senzor**

Scopul studiului de față a fost o comparare a tehnicilor de diagnostic molecular al markerilor tumorali cel mai des studiate pentru cancerul de pancreas – CA 19-9 și CEA. Markerii au fost testați prin detecție ELISA, IHC și detecție pe senzor stochastic. Markerul tumoral HER-1 a fost considerat studiul pilot deoarece nu este un marker specific cancerului de pancreas, el fiind regăsit în multe alte tumori – plămân, cap, tegument, digestiv și prezența sa este asociată cu agresivitate tumorală.

#### **8.6.1 Testarea CA 19-9 comparativă ELISA/immunohistochimie/senzor**

Markerul CA 19-9 reprezintă etalonul tumorilor pancreatice. Prezența unui nivel crescut, peste limitele normale în sânge este asociată de cele mai multe ori cu prezența unei tumori pancreatice. Pacienții selectați pentru testarea pe senzorul stochastic erau deja cunoscuți cu tumori pancreatice în diferite stadii de boală.

Pentru testarea pe tehnica ELISA, deși valorile pozitive sunt cunoscute ca fiind peste 37 U/ml, noi le-am considerat pozitive numai pe acelea care au fost găsite peste această limită. Rezultatele sunt aproximativ identice ceea ce confirmă faptul că testarea sangvină a CA 19-9 pe senzor poate fi utilizată ca tehnică de screening pentru cancerul de pancreas.

Din analiza datelor prezentate reiese faptul că expresia imunohistochimică a valorilor CA19-9 se corelează în proporție de peste 90% cu rezultatele testării CA 19-9 pe senzor stochastic, conform Tabelului 19. Se constată că valorile rezultatelor obținute de la pacienți recoltate sunt similare cu expresia imunohistochimică a valorilor CA19-9.

#### **8.6.2 Testarea CEA comparativă ELISA/immunohistochimie/senzor**

În urma analizării CEA prin cele trei tehnici ELISA, IHC și testarea pe senzor se constată o ușoară discordanță între rezultatele obținute între testarea ELISA și testarea pe senzor din fluidele biologice, respectiv sânge. Astfel în stadiul II de boală prin testarea ELISA rezultatele au fost în limite normale (nu au depășit 37 U/ml) în timp ce în urma testării pe senzor toate rezultatele au fost pozitive. De asemenea în stadiul III de boală rezultate pozitive prin testarea ELISA au fost la un număr de 5 pacienți din 8, în timp ce la testarea pe senzor la toți pacienții au fost obținute rezultate pozitive.





### **8.6.3 Testarea HER-1 comparativă imunohistochimie/senzor**

Prin prezentarea pacienților care au prezentat valori pozitive HER-1 la testarea IHC comparativ cu rezultatele obținute prin testarea pe senzorul stochastic se observă că un număr de 24 de cazuri care prezentau HER-1 pozitiv prin analiza IHC au avut corespondență în 23 de cazuri la testarea HER-1 pe senzorul stochastic.

Aceste rezultate ne determină să concluzionăm că se poate realiza testarea HER-1 și din sânge în vederea îndrumării pacientului către un diagnostic personalizat și în același timp realizarea unei urmăriri a eficienței terapeutice prin analiza HER-1 sangvină prin senzor stochastic.

### **8.7. Analiza datelor de supraviețuire**

CP rămâne una dintre cele mai severe neoplazii, persoanele care se îmbolnăvesc, trăind în jur de 5-6 luni după diagnostic.

#### **8.7.1 Dispersia metastazelor pe grupe de vârstă**

Se observă că rata mortalității este de 91% iar la grupa de vârstă 75-84 de ani incidența bolii este egală cu mortalitatea (100%). La toate stadiile IV de boală au fost găsite metastaze iar rata medie de supraviețuire a fost mai mică de 3 luni de la diagnosticare.

Din graficul prezentat se poate urmări incidența cea mai mare a diagnosticelor specifice CP, mai ales la grupele de vârstă 65-74 de ani și 55-64 de ani și 71-80 de ani iar din punct de vedere al genului, toate cazurile sau constatat atât la femei cât și la bărbați.

#### **8.7.2 Dispersia pacienților decedați pe grupe de vârstă**

Cea mai joasă rată de supraviețuire se înregistrează în stadiul IV a CP, în deosebi la pacienții neoperabili. În cazul eșantionului luat în studiu rata mortalității raportată la total cazuri este de 86% și raportată la numărul de cazuri aflate în stadiile III și IV este de 91%.

Din analiza noastră se poate constata că:

- CP reprezintă una din cele mai severe neoplazii. Este unicul cancer în care incidența este egală cu mortalitatea;
- Nivelul mortalității crește direct proporțional cu avansarea procesului tumoral;
- Datorită adresării tardive și a evoluției rapide a bolii, majoritatea pacienților au tumori neoperabile la momentul diagnosticării ceea ce reduce esențial indicele de supraviețuire.

## **9. ANALIZA ECONOMICĂ A COSTURILOR DE DIAGNOSTICARE**



Din analiza costurilor realizate prin cele trei metode (IHC, ELISA și senzor stohastic), pe eșantionul de 36 de pacienți selectați, rezultă în mod evident valoarea economiilor realizate prin cea de a treia metodă. Extinzând eșantionul la un număr de 2000 de subiecți rezultă o economie considerabilă, conform Tabelului IX.1.

La evaluarea costurilor am prezumat următoarele:

- au fost luate în considerație numai costurile analizelor, fără costurile de spitalizare;
- pentru calculul economic am avut în vedere managementul diferențiat pentru diagnostice diferite de CP;
- pentru calculul economic am avut în vedere analiza costurilor pentru depistarea diagnosticului, în funcție de diversele faze de prezentare a pacientului, conform datelor prezentate în Tabelul IX.2.

Este evident că economia care se realizează folosind metoda de diagnosticare prin senzor stohastic este importantă. Dar chiar dacă este necesară efectuarea coroborată a diagnosticării prin mai multe metode (ELISA și senzor stohastic) costurile sunt mai reduse, de la 170 lei/pacient la 500 lei/pacient.

Nu trebuie pierdută din vedere economia de timp realizată prin metoda de diagnosticare cu senzor stohastic: de la 20 de minute la maximum 30 de zile prin IHC.

## **10.CONCLUZII**

### **10.1 Concluzii**

Scopul acestui studiu, a fost de a evalua comparativ nivelul markerilor tumoralii de importanță biologică CA19-9, CEA și HER-1, în vederea detecției cancerului de pancreas prin analiză de probe biologice pe senzori stocastici confirmat Histopatologic și Imunohistochimic din probe biologice – țesut pancreatic tumoral și sânge. Tehnicile de detecție utilizate au fost: testul ELISA și analiza electrochimică prin senzori stocastici din ser (sânge) , respectiv din țesut tumoral de pancreas prin determinări imunohistochimice de CA 19-9, CEA și HER-1.

Obiectivele stabilite în vederea realizării scopului propus, enumerate mai jos, au fost îndeplinite în proporție de 90%:

1. Sinteza studiilor științifice publicate în bazele de date de specialitate naționale și internaționale în scopul stabilirii nivelului actual de informații relevante cu privire la tema supusă cercetării;



2. Stabilirea criteriilor de selecție a subiecților în studiu;
3. Alegerea eșantionelor de subiecți cu scopul de a participa la studiul de față;
4. Prezentarea unei metode noi pentru determinarea rapidă și fiabilă a panelului de biomarkeri format din: CA19-9, CEA, HER-1, în cancerul de pancreas;
5. Cercetarea comparativă a factorilor biomoleculari, a relațiilor și asocierilor dintre aceștia, atât prin analiza fluidelor biologice, cât și prin analiza imunohistochimică, în vederea diagnosticului rapid în cancerul de pancreas;
6. Analiza economică a costurilor pentru depistare precoce comparativ cu costurile de diagnostic personalizat;
7. Prezentarea rezultatelor cercetării.

În urma realizării studiului de față rezultă următoarele concluzii:

1. Diagnosticul histopatologic urmat de analiza IHC reprezintă una din cele mai sigure metode de diagnostic al cancerului de pancreas. Rezultatele obținute la Capitolul 8, subcapitolul 8.3, diagramele din Figurile 8.17- 8.20 confirmă acest lucru.
2. Având în vedere rezultatele obținute în urma studiului comparativ al CA 19-9, CEA și HER-1 prin cele trei tehnici de analiză (ELISA, prin senzor stohastic și IHC) se constată că cele mai apropiate valori au fost obținute în urma analizei IHC și a testării pe senzori stocastici. Ca urmare, având în vedere costul mic și timpul de lucru foarte scăzut (20 de minute) pentru determinarea acestor markeri, concluzionăm că utilizarea testării prin senzori stocastici este mult mai eficientă în diagnosticul pacienților, cu scop de screening, în vederea depistării precoce a cancerului de pancreas, inițierea investigațiilor de maximă precizie pentru a stabili un diagnostic personalizat, debutul precoce al tratamentului personalizat, având ca urmare creșterea speranței de viață a pacienților. Această concluzie reiese și din studiul nostru la *Capitolul 8, subcapitolul 8.4 și 8.5.*
3. Creșterea speranței de viață prin diagnosticare precoce și depistarea bolii în stadii incipiente de boală; Pacienții care au putut fi îndrumați mai repede spre o schemă de tratament adecvată au avut o rată de supraviețuire mai mare, conform diagramele prezentate la *Capitolul 8, Subcapitolul 8.7.*
4. Timp de determinare scăzut cuprins între 5 și 20 minute, costuri reduse la detecție timpurie pe sensor circa 20 lei pentru o analiză;



S-a constatat că detecția pentru CA 19-9 preoperator pe senzor, prin analiza de sânge, este regăsită prin analiza de țesut tumoral de CA 19-9 din expresia imunohistochimică, *Capitolul 8, Subcapitolul 8.4;*

5. Din studiu reiese că detecția CA 19-9 preoperator pe senzor din sânge este mai ridicată decât valorile Ca 19-9 din sânge prin analiza ELISA;
6. S-a constatat că valorile CEA preoperator în urma analizei pe senzor sunt aproximativ identice cu valorile CEA din expresia imunohistochimică
7. Detecția CEA pe senzor a fost mai crescută față de detecția acestui marker prin tehnica ELISA;
8. S-a constatat că valorile HER1 preoperator pe senzor sunt identice cu valorile HER1 din expresia imunohistochimică.
9. În Anexa 6 sunt prezentate datele care au permis realizarea studiului comparativ și care au condus la concluzionarea că există o corelație directă între metodele verificate.
10. Având în vedere faptul că CEA, CA –19-9 și HER-1 au fost testate concomitent atât prin senzor cât și prin Analiza sanguină ELISA, respectiv prin analiza imunohistochimică din țesut tumoral postoperator, s-a constatat că prezența CA 19-9 a fost aproximativ egală (proporție de 90%) conform datelor prezentate la *Capitolul 8, subcapitolul 8.6, diagramele prezentate în Figurile 8.30 – 8.35.*
11. Determinările acestor analiți au fost facute la toți pacienții internați în Clinică, cu Diagnosticul de Cancer al Pancreasului, indiferent de stadiul de boală, cei mai mulți pacienți fiind internați în stadiul IV așa cum reiese din tabelele prezentat în *Anexele 1,2 și 3.*
12. Alte concluzii ale acestui studiu vin să confirme statisticile internaționale, astfel:
  - ✓ CP reprezintă una din cele mai severe neoplazii. Este unicul cancer în care incidența este aproximativ egală cu mortalitatea și reprezintă motivul căutării de noi tehnici de diagnostic rapid, ieftin , în populația cu risc crescut de a face boala.
  - ✓ Este obligatorie crearea unei scheme de tratament personalizat cu scopul creșterii ratei de supraviețuire a pacienților diagnosticați cu cancer de pancreas;
  - ✓ Mortalitatea crescută în rândul pacienților diagnosticați cu CP ne determină să abordăm noi căi de cercetare în vederea depistării acestei boli în faze incipiente de boală și reducerea pe termen mediu-lung a mortalității specifice prin intervenții de screening organizat. *Studiu prezentat în Capitolul 8, subcapitolul*



8.7, în diagramele prezentate în *subcapitolele 8.7.1 și 8.7.2 din Figurile 8.37 – 8.39;*

- ✓ Mai multe studii au arătat că nivelul antigenului carbohidrat 19-9 (CA19-9) și antigenul carcinoembrionar (CEA) sunt markeri utili pentru detecția precoce a Cancerului de Pancreas și ajută la îndrumarea pacientului pentru un diagnostic personalizat și un tratament eficient personalizat. În studiul de față s-a putut observa că o analiză a celor trei markeri în panel poate fi luată în considerare pentru abordarea unei terapii personalizată la *Capitolul 8, Subcapitolul 8.6, diagramele din figurile 8.30-8,35;*
- ✓ Cancerul pancreatic este o boală a adulților în vârstă, majoritatea cazurilor apărând la pacienții cu vârsta între 60 și 80 de ani, așa cum reiese și din acest studiu, în *Capitolul 8 Rezultate, subcapitolul 8.2 Parametri Clinici Și Epidemiologici;*
- ✓ CA 19-9 poate fi testat atât prin analiza fluidelor biologice cât și prin analiza de țesut tumoral în CP prin IHC și este considerat marker predictor semnificativ al detecției, monitorizării evoluției și a recurenței timpurii a acestei boli;
- ✓ Analiza CEA – se realizează în corelație directă cu analiza CA 19-9 și prezintă caracteristici de răspuns bun și fiabil. Numai microsensorul bazat pe graphene a fost capabil să analizeze CEA în probe de sânge integral, cu precizie acceptabilă;
- ✓ Rezultatele obținute utilizând senzorii stochastici au fost comparate cu cele obținute prin metodele clasice de analiză (ELISA și IHC) – și s-a constatat o bună corelație, studiu urmărit la *Capitolul 8, Subcapitolul 8.6, diagramele din figurile 8.31 - 8.34.* O astfel de metodă este foarte eficientă pentru depistarea precoce a cancerului de pancreas, în stadiul în care pacientul nu prezintă semne clinice de boală iar eficiența tratamentului personalizat poate fi crescută;
- ✓ Această metoda de screening care utilizează panelul de biomarkeri poate aduce un mare plus și pentru controlul eficienței tratamentului, fiind foarte ieftină și fiabilă așa cum reiese de altfel și în *Capitolul 9, subcapitolul 9.1, diagramele 9.1 și datele prezentate în tabelul IX.1 si 2.*

## 10.2 Contribuții proprii

Detectarea stocastică, este o tehnică electrochimică, chronoamperometrică selectată pentru măsurătorile de  $t_{off}$ , la un potențial constant de 125 mV. Potențialul aplicat este cel



care conduce analitul prin canal sau pori; în consecință, trebuie aleasă o valoare pentru care valoarea semnăturii moleculare ( $t_{off}$ ) poate fi consultant de încredere - de obicei, este de preferat să nu fie mai mică de 1 ms. Electrozii sunt scufundați într-un minirecipient care conține proba biologică în scopul determinării markerilor tumorali în diferite concentrații. Durata unor astfel de determinări este de câteva minute, ceea ce reprezintă un câștig în orientarea pacientului către un diagnostic precoce și instituirea rapidă a unui tratament eficient.

Studiul de față poate crea permisele dezvoltării unei metodologii de abordare a diagnosticului personalizat al Cancerului de Pancreas, pe platforme multimod ale senzorului stochastic, care are posibilitatea de a testa mai mulți markeri tumorali într-un timp foarte scurt, de cca 20 de minute. În urma acestor observații putem propune următoarele etape de management pentru diagnosticul și tratamentul cancerului de pancreas (prezentate și în diagrama din *Figura 9.1 de la Capitolul 9*):

- ✓ Screening al populației cu factori de risc, prin detecție de marker tumorali cu senzori stochastici, având ca rol principal depistarea bolii în stadii incipiente;
- ✓ Investigații imagistice însoțite de procedurile pentru depistarea tumorilor pancreatice; prelevare de biopsii din formațiunile tumorale prin ghidare imagistică - ecoendoscopie; recoltare de lichid pancreatic prin ERCP;
- ✓ HP și citologie;
- ✓ CHIRURGIE RADICALĂ, rezecție cu limită de siguranță oncologică, în cazuri limită;
- ✓ Diagnostic personalizat;
- ✓ Tratament personalizat eficient sub control de marker tumorali pe sensor stochastic.



## **BIBLIOGRAFIE selectivă**

- Ahn SS, Kim MJ, Choi JY, et al. Indicative findings of pancreatic cancer in prediagnostic CT. *Eur Radiol* 2009; 19: 2448–55;
- Angelescu. Patologia pancreatică. *Tratat de Patologie Chirurgicală, Vol.II*, 2001; 2025-2043;
- AK Rustgi Familial pancreatic cancer: genetic advances, *Genes Dev*, 28 (2014), pp. 1-7;
- A.M. Macgregor-Das, C.A. Iacobuzio-Donahue; Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis; *J Surg Oncol*, 107 (2013), pp. 8-14;
- A.M. Macgregor-Das, C.A. Iacobuzio-Donahue, Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis, *J Surg Oncol*, 107 (2013), pp. 8-14;
- Attam R, Arain MA, Bloechl SJ, et al. “Wet suction technique (WEST)”: a novel way to enhance the quality of EUS-FNA aspirate. Results of a prospective, single-blind, randomized, controlled trial using a 22-gauge needle for EUS-FNA of solid lesions. *Gastrointest Endosc* 2015; 81: 1401–07;
- A.V. Biankin, N. Waddell, K.S. Kassahn, M.C. Gingras, L.B. Muthuswamy, A. Johns, et al., Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes, *Nature*, 491 (2012), pp. 399-405;
- Bergquist JR, Puig CA, Shubert CR, et al. Carbohydrate antigen 19-9 elevation in anatomically resectable, early stage pancreatic cancer is independently associated with decreased overall survival and an indication for neoadjuvant therapy: a National Cancer Database study. *J Am Coll Surg*. 2016;223(1):52–65. [PubMed];
- B.M. Grüner, H. Hahne, P.K. Mazur, M. Trajkovic-Arsic, S. Maier, I. Esposito, et al., MALDI imaging mass spectrometry for in situ proteomic analysis of preneoplastic lesions in pancreatic cancer, *PLoS One*, 7 (2012), p. e39424;
- Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer*. 2002; 39: 99-166;
- Cao D, Zhang Q, Wu LS-F, Salaria SN, Winter JW, Hruban RH, et al. Prognostic significance of maspin in pancreatic ductal adenocarcinoma: tissue microarray analysis of 223 surgically resected cases. *Mod Pathol*. 2007; 20: 570±8;
- Carlos Fernández Moro<sup>1,2\*</sup>, Alejandro Fernandez-Woodbridge<sup>3</sup>, Melroy Alistair at ALL, Immunohistochemical Typing of Adenocarcinomas of the Pancreatobiliary System Improves Diagnosis and Prognostic Stratification *PLOS ONE*, Immunoprofiling Adenocarcinomas of the Pancreatobiliary System, 2016, 11(11): e0166067;

**Lucrări publicate**

REVIEW
--------

**TECHNIQUES FOR DETERMINING CA 19-9 IN PANCREATIC  
CANCER - A BRIEF REVIEW**

**I Turcan<sup>1,2</sup>, Oana Ciocîrlan<sup>2</sup>, S Grădinaru<sup>1,2</sup>, A Dumitru<sup>1,2</sup>, Florentina  
Gherghiceanu<sup>2</sup>,  
S. Oprescu<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>University Emergency Hospital Bucharest, Romania

<sup>2</sup>University of Medicine and Pharmacy "Carol Davila" Bucharest, Romania

Corresponding author: Florentina Gherghiceanu

Phone no.: 0758060909

E-mail: fgherghiceanu@gmail.com

**Abstract**

*Due to increased morbidity and mortality in pancreas cancer, it is necessary to find new methods of population screening. Elevated plasma levels of CA 19-9 antigen is a nonspecific warning sign for pancreatic cancer, an aggressive cancer which is very rarely diagnosed in the early stages. Although the identification of the presence of CA 19-9 antigen has a low sensitivity and specificity and frequent false positive results, clinical detection of CA 19-9 levels in human serum would be an advantageous strategy for increasing the effectiveness of treatment protocols for pancreatic cancer. Several techniques have been developed to detect CA 19-9, such as the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA technique), electrochemical determination on the stochastic sensor and immunohistochemical determination in pancreatic tumor tissue. The aim of this review is to describe those methods and their importance for CA19-9 determination.*



**Keywords:** *pancreas cancer, CA 19-9, screening, immunosorbent assay, immunohistochemical determination*

---

## **Introduction**

Pancreatic cancer is a highly aggressive malignancy with an average 5-year survival rate that does not exceed 5% worldwide [1], characterized by a rapid spread of the tumor and a poor prognosis [2]. At the time of diagnosis, most patients are in advanced stages of the disease, with the presence of metastases, less than 15% of patients may benefit from a potentially curative treatment and up to 30% of patients die in the first 12 months [3].

Due to increased morbidity and mortality in pancreas cancer, it is necessary to find new methods of screening the population. Screening is required in families who have had at least one person diagnosed with pancreatic cancer, pancreatic pseudocyst, acute recurrent pancreatitis, chronic pancreatitis, pancreatic atrophy, smokers, alcoholics, diabetes mellitus, obesity, people who carry out toxic environment [1].

Diagnosing cancer at an early stage increases the chance of patient survival. It has been shown that blood levels of biological and biochemical molecules (enzymes, nucleic acids, antibodies, carbohydrates, peptides, hormones, metabolic compounds or biological processes such as apoptosis or proliferation) can be correlated with various pathologies. In clinical

practice, in the treatment of cancer, biomarkers are used in screening, diagnosis, prognosis or progression of the disease, the recurrence of the disease or monitoring the outcome of the therapy [2].

Elevated plasma levels of CA 19-9 antigen is a nonspecific warning sign for pancreatic cancer, an aggressive cancer which is very rarely diagnosed in the early stages. These elevated levels of CA 19-9 may also be related to pathologies such as: pancreatitis, obstructive jaundice, breast cancer, lung cancer, ovarian cancer, digestive tract cancer. Although the identification of the presence of CA 19-9 antigen has a low sensitivity and specificity and frequent false positive results, clinical detection of CA 19-9 levels in human serum would be an advantageous strategy for increasing the effectiveness of the development of treatment protocols for pancreatic cancer [2].

Several techniques have been developed to detect CA 19-9, such as the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA technique), electrochemical determination on the stochastic sensor and immunohistochemical determination in pancreatic tumor tissue [4].

---

## **Results and Discussions**

### *Determination of CA 19-9 using ELISA technique*

ELISA technique (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) is currently one of the most commonly used methods of identifying and quantifying antigens, antibodies, hormones, cytokines and a wide variety of other molecules, including synthetic peptides [5].

CA 19-9 is a “mucin-like” antigen with molecular weight above 1000 KDa present in both fetal structures (epithelial tissues in the stomach, intestine, liver, pancreas) and adult structures (pancreas, liver, gall bladder, lung). This marker can be detected from several biological fluids - blood, serum, saliva, sputum, bronchial secretions, seminal fluid, cervical mucus, digestive secretions, amniotic fluid. The value considered normal by this assay is 37 U / ml. It is considered the primary marker in pancreas cancer in conjunction with CEA, and elevated values are correlated with advanced stages of tumors [6].

The CA19-9 ELISA test is based on the principle of a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay. The assay system uses a monoclonal antibody directed against a distinct antigenic determinant on the intact CA 19-9 molecule used for the solid phase on the microtiter wells. Another monoclonal antibody is conjugated to horseradish peroxidase (HRP) against CA 19-9 in the antibody-enzyme conjugated solution. The test sample is allowed to sequentially react with the two antibodies resulting in the CA 19-9 molecule sandwich

molecule between the solid phase and the enzyme-linked antibodies. After two incubation steps separated at 37 ° C for 90 minutes, the wells are washed with Wash Buffer to remove unbound labeled antibodies. A solution of TMB Reagent was added and incubated for 20 minutes resulting a blue color. Color development is stopped by adding Stop Solution by changing the color to yellow. The concentration of CA19-9 is directly proportional to the color intensity of the sample test. Absorbance is measured spectrophotometrically at 450 nm [7].

### *Detection of CA 19-9 by electrochemical determination on a stochastic sensor*

The molecular detection of CA 19-9 in whole blood samples was performed using tools used for molecular recognition. These devices are platforms based on nanostructured materials such as Mn (III) complex with meso-tetra (4-carboxyphenyl) porphyrin and maltodextrin (dextrose equivalence between 4 and 7) immobilized in diamond paste, graphite paste or fulgiren C60 paste. CA 19-9 identification in blood samples at the molecular level is performed using the stochastic mode and is followed by quantification of it using stochastic and voltammetric differential pulse modes. CA 19-9 can be identified in the wide concentration range from 0.0005 to 150 U ml<sup>-1</sup> with a detection limit of 0.0002 U ml<sup>-1</sup> (S / N3) using the stochastic mode, making early detection possible of cancers such as gastrointestinal and pancreatic cancer. It presents a high sensitivity and

reliability in these samples, so it recommends these tools for molecular screening.

Porphyrins and polymeric surfactants have been used as modifiers for diamond and carbon pastes in sensor design. Stochastic sensors were able also to determine both L- and D-fucose in whole blood samples (qualitative and quantitative). L-Fucose is an important monosaccharide found in prokaryotes and eukaryotes and its concentration increases in diabetes, hepatic cancer due to the fucosidase process, urinary can be excreted as free L-fucose as a marker of digestive cancer.

Diamond has become an important element in electrodes design due to its chemical properties: inertia and stability. These electrodes have opened new opportunities for analyzing biologically important molecules, especially when used as stochastic microsensors. Stochastic sensors can use the marker's signature to determine its presence in the serum and can also determine its amount in the biological fluid. Several carbon-based stochastic and potentiometric microsensors are used for the enantioselective design of potentiometric sensors and / or marked carbon paste with porphyrins: Zn5,10,15,20, tetra (4-sulfophenyl) porphyrin (ZnTSPP); 5,10,15,20-tetra (4-sulfophenyl) porphyrin (TSPP) and polymeric surfactants: SUV (Polysodium N-Undecanoyl-L-vanillate); SULV (Non-undecanoyl-L-leucylvanilate Polysodium) [8].

*Immunohistochemical determination of CA 19-9 from pancreatic tumor tissue*

Currently, tumors of the pancreatobiliary system are classified and organized on the basis of the anatomical origin site (AJCC, UICC-TNM, 7th Edition) [9, 10].

Typical anatomopological pancreatic cancer types are: pancreatic intraepithelial neoplasm, ductal adenocarcinoma, undifferentiated carcinoma, pancreatic squamous or adenosquamous carcinoma, serum cystadenoma, acinar cystadenoma, mucous cyst neoplasm, intraductal papillary neoplasia, intraductal tubulopapillar neoplasia, pancreatic cell carcinoma, pancreatoblastoma, pancreatic dermoid cyst, pancreatic neuroendocrine neoplasm, poorly differentiated neuroendocrine pancreatic carcinoma, pseudopapillary tumors, endocrine pancreatic cancer [11].

The most common histological type is adenocarcinoma (85-95%) with ductal origin, generally poorly differentiated; rarely epidermoid carcinomas are encountered, where pulmonary metastatic dissemination is typical. Extremely rare are mucinous cystadenocarcinoma (slow-growing tumor preferentially developed in the body and the tail of the pancreas, more frequent in female sex), papillary carcinomas or those in "ring with seals" [12,13].

A representative block based on hematoxylin-eosin staining is selected for immunohistochemistry for each diagnostic sample (resection sample or biopsy). It stains with a panel made up of up to 38 antibodies, 27 of which were finally considered for analysis

after the missing data was removed. These are all conventional antibodies widely used in the pathology of the diagnosis, including markers for intermediate filaments [14] (CK5, CK7, CK17, CK18, CK19, CK20, vimentin) and mucins [15] (MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6) are commonly used to differentiate between different types of epithelium (e.g. squamous, glandular) and subtypes (e.g. glandular and pancreatobiliary); common markers expressed in adenocarcinomas of gastrointestinal and pancreatobiliary origin (BerEP4, EMA, CEA monoclonal [16], polyclonal CEA, CA19-9, CA125 [17], maspin [18]); intestinal transcription factor CDX2, tumor suppressor proteins [19] (p53, SMAD4), Ki67 proliferation marker, p63 for differentiation of squamous cells, chromogen A neuroendocrine marker, CD10 staining microvilli / brush border, CD56 marker, WT1 protein expression has been described in a variety of tumor types [20].

Immunoreactivity is assessed quantitatively by pathologists by visual examination of the entire section and is recorded using a continuous numeric score (from 1 to 100) based on the percentage of colored tumor cells [21, 22].

---

## Conclusions

Several techniques have been developed to detect CA 19-9, such as the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA technique), electrochemical determination on the stochastic

sensor and immunohistochemical determination in pancreatic tumor tissue. Those methods were developed in order to find a better way for early diagnosis of pancreatic cancer, but the multitude of techniques indicates that we cannot consider we found the perfect one so far.

---

## References

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. *Cancer statistics, 2012*. *CA Cancer J Clin*. 2012;62:10–29. doi: 10.3322/caac.20138.
- [2] Qian Dong, Xiang-hong Yang, Yao Zhang, Wei Jing, Li-qiang Zheng, Yun-peng Liu, Xiu-juan Qu; *Elevated serum CA19-9 level is a promising predictor for poor prognosis in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma: a pilot study* - *World Journal of Surgical Oncology*2014; 12:171
- [3] Kimura K, Amano R, Nakata B, Yamazoe S, Hirata K, Murata A, Miura K, Nishio K, Hirakawa T, Ohira M, Hirakawa K. *Clinical and pathological features of five-year survivors after pancreatectomy for pancreatic adenocarcinoma*. *World J Surg Oncol*. 2014;12:360. doi: 10.1186/1477-7819-12-360.
- [4] Rizzardi AE, Johnson AT, Isaksson Vogel R, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, et al. *Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring*. *Diagn Pathol*. 2012;7: 42 doi: 10.1186/1746-1596-7-42
- [5] Ji-Cong GuiWei-Li YanXing-Dang Liu, *CA19-9 and CA242 as tumor markers for the diagnosis of pancreatic cancer: a meta-analysis*. *Clinical and Experimental medicine*, May 2014, Volume 14, Issue 2, pp 225–233
- [6] <http://www.mymed.ro/markeri-tumoral.html>

- [7] <https://www.alpco.com/pdfs/25/25-199HU-E01.pdf>
- [8] Iuliana Moldoveanu, Raluca-Ioana Stefan-van Staden, Constantina P. Kapnissi-Cristodoulou, Jacobus Frederick van Staden, Hassan Y. Aboul-Enein. *Challenges in the enantioanalysis of fucose using stochastic and potentiometric microsensors*. Sensing and Bio-Sensing Research 1 (2014) 1–7
- [9] Edge SB, Byrd DR, Compton CC, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010.
- [10] Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2009.
- [11] LAMPS, Misdraji, Yerian, Deshpande, Kim Kakar, Mino-Kenudson, Wang Yeh, Karadine; *Diagnostic Pathology Hepatobiliary & Pancreas*, Section 5, Tumors of the Pancreas, AMIRSYS, 2011, pp II-5-2 --- II -5- 58.
- [12] L.A. Torre, F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. *Jemal Global cancer statistics*, 2012; CA Cancer J Clin, 65 (2015), pp. 87-108
- [13] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. *Jemal Cancer statistics*, 2015; CA Cancer J Clin, 65 (2015), pp. 5-29
- [14] Chu PG, Weiss LM. *Keratin expression in human tissues and neoplasms*. *Histopathology*. 2002;40: 403–439. doi: 10.1046/j.1365-2559.2002.01387.
- [15] Yonezawa S, Higashi M, Yamada N, Yokoyama S, Goto M. *Significance of mucin expression in pancreatobiliary neoplasms*. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2010;17: 108–24. doi: 10.1007/s00534-009-0174-7
- [16] Hornick JL, Lauwers GY, Odze RD. *Immunohistochemistry can help distinguish metastatic pancreatic adenocarcinomas from bile duct adenomas and hamartomas of the liver*. *Am J Surg Pathol*. 2005;29: 381–9.
- [17] Einama T, Kamachi H, Nishihara H, Homma S, Kanno H, Takahashi K, et al. *Co-Expression of Mesothelin and CA125 Correlates With Unfavorable Patient Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. *Pancreas*. 2011;40: 1276–1282. doi: 10.1097/MPA.0b013e318221bed8
- [18] Cao D, Zhang Q, Wu LS-F, Salaria SN, Winter JW, Hruban RH, et al. *Prognostic significance of maspin in pancreatic ductal adenocarcinoma: tissue microarray analysis of 223 surgically resected cases*. *Mod Pathol*. 2007;20: 570–8. doi: 10.1038/modpathol.3800772
- [19] Oshima M, Okano K, Muraki S, Haba R, Maeba T, Suzuki Y, et al. *Immunohistochemically detected expression of 3 major genes (CDKN2A/p16, TP53, and SMAD4/DPC4) strongly predicts survival in patients with resectable pancreatic cancer*. *Ann Surg*. 2013;258: 336–46. doi: 10.1097/SLA.0b013e3182827a65
- [20] Nakatsuka S, Oji Y, Horiuchi T, Kanda T, Kitagawa M, Takeuchi T, et al. *Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells*. *Mod Pathol*. 2006;19: 804–814. doi: 10.1038/modpathol.3800588
- [21] Rizzardi AE, Johnson AT, Isaksson Vogel R, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, et al. *Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring*. *Diagn Pathol*. 2012;7: 42 doi: 10.1186/1746-1596-7-42
- [22] Fedchenko N, Reifenrath J. *Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue—a review*. *Diagn Pathol*. 2014;9: 221 doi: 10.1186/s13000-014-0221-9

## PILOT STUDY FOR BIOMARKER CHARACTERIZATION OF A SAMPLE POPULATION OF ROMANIAN CANCER PATIENTS

**I Turcan<sup>1,2</sup>, Amelia Voinea<sup>2</sup>, S Grădinaru<sup>1,2</sup>, A Dumitru<sup>1,2</sup>, Florentina  
Gherghiceanu<sup>2</sup>,  
S. Oprescu<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> University Emergency Hospital Bucharest, Romania

<sup>2</sup> “Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy Bucharest, Romania

Corresponding author: Florentina Gherghiceanu

Phone no.: 0758060909

E-mail: fgherghiceanu@gmail.com

### **Abstract**

*Pancreatic cancer is one of the most aggressive cancers, with a very high mortality rate. Currently several biomarkers are used for early detection of pancreatic cancer and can be a guide for surgical decisions. The most commonly used are carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) and carcinoembryonic antigen (CEA). We used several detection techniques: ELISA and electrochemical analysis by serum stochastic sensors, respectively whole blood and immunohistochemical determinations of CA 19-9 from tumor tissue to describe a sample of pancreatic cancer patients. We analysed biological samples from 34 patients: 23 patients with stage IV, 7 patients with stage III and for 4 patients with stage 4. Our results are consisted with the ones reported in literature, thus we can use our population samples in further studies that will develop a rapid molecular diagnosis technique with increased sensibility, reliable, reproducible and at a low-cost. This could be used as a screening test for the individuals with a high-risk of developing pancreatic cancer. To increase survival in this type of cancer, an early detection and personalized treatment is needed.*

**Keywords:** *pancreatic cancer, biomarkers, CA 19-9, ki67, stochastic sensor, ELISA, immunohistochemistry*

---

## Introduction

Pancreatic cancer is a very aggressive disorder, with a 5-year overall survival of about 5%. It is usually diagnosed in advanced states what have limited therapeutic options [1]. Pancreatic cancer is currently the fourth leading cause of cancer deaths in the United States and Europe [2]. The 2016, the annual report on the European cancer death rate indicated an increase in pancreatic cancer mortality [3]. According to the World Health Organization (WHO) statistics 2016, the mortality in pancreas cancer is 89% [4]. 20% of patients with pancreatic cancer are candidates for a radical resection, and 60% of patients have a local and systemic relapse within the first 12 months after curative surgery [5]. Several studies have shown that levels of carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) and carcinoembryonic antigen (CEA) are useful markers for early detection of pancreatic cancer and can be a guide for surgical decisions [6]. In the literature, there are various studies that demonstrate inadequate sensitivity and specificity that limit the use of CA 19-9 and CEA in early screening and early diagnosis of pancreatic cancer [5].

The rate of disease progression in pancreatic cancer is very high. This type of

cancer is characterized by a rapid spread of the tumor and a poor prognosis [7]. At the time of diagnosis, most patients have developed metastasis. Less than 15% of patients can receive a curative treatment and up to 30% of patients die in the first 12 months [8].

In this context, a scientific research project - "STOCHASTIC MICROSENSORS - NEW INSTRUMENTS FOR QUICK DETERMINATION OF BIOLOGICAL IMPORTANCE MATERIALS" - PN II Idei was initiated in Romania. It was approved with the identification number 123/2011 at the Executive Unit for Financing Higher Education, Research, Development and Innovation (UEFISCDI). This study was coordinated by Professor Raluca Ioana van Staden Phd., PATLAB, Timisoara, in collaboration with the Carol Davila University of Medicine and Pharmacy Bucharest. The Research Ethics Committee of UMF "Carol Davila" approved the study No: 11 of 21 October 2013.

Our project aims to discover a rapid molecular diagnosis technique with increased sensibility, reliable, reproducible, low-cost. This could be used as a screening test for the individuals with a high-risk of developing pancreatic cancer. To increase survival in this type of cancer, an early detection and personalized treatment is needed.

We first needed to have a better understanding of the Romanian pancreatic cancer patients to verify if our new diagnosis technique could be applicable in other populations than the one on which we developed it.

Currently, tumors of the pancreatobiliary system are classified and organized on the basis of the anatomical origin site (AJCC- The American Joint Committee on Cancer, UICC-TNM, 7th Edition) [13,14].

Typical anatomopathological pancreatic cancer types are: intraepithelial pancreatic neoplasm, ductal adenocarcinoma, undifferentiated carcinoma, pancreatic squamous or adenosquamous carcinoma, serum cystadenoma, acinar cystadenoma, mucous cyst neoplasm, intraductal oncocytic papillary neoplasm, intraductal tubulopapillary neoplasia, pancreatic cell carcinoma, pancreatoblastoma, pancreatic dermoid cyst, pancreatic neuroendocrine neoplasm, poorly differentiated neuroendocrine pancreatic carcinoma, pseudopapillary tumor, endocrine pancreatic cancer [15].

The most common type of histology is adenocarcinoma (85-95%) of ductal origin, generally poorly differentiated; rarely epidermoid carcinomas are encountered. The latter is frequently associated with pulmonary metastatic dissemination. Extremely rare are mucinous cystadenocarcinoma (slow-growing tumors preferentially developed in the pancreas body and tail, more frequent in female sex), papillary carcinomas or signet ring pancreatic cancer [16,17].

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is currently one of the most commonly used methods of identifying and quantifying antigens, antigens, hormones, cytokines and a wide range of other molecules, including synthetic peptides.

CA 19-9 is a mucin-like antigen of molecular weight above 1000 KDa present in both fetal structures (epithelial tissues in the stomach, intestine, liver, pancreas) and adult (pancreas, liver, gall bladder, lung). This marker can be detected in several biological fluids - blood, serum, saliva, sputum, bronchial secretions, seminal fluid, cervical mucus, digestive secretions, amniotic fluid. The value considered normal by this assay is under 37 units per milliliter. It is considered the primary marker in pancreas cancer in conjunction with CEA. Elevated values are correlated with advanced stages of tumors [12].

---

## Materials and methods

The Pilot Study on the Panel of Pancreatic Cancer Patients in the PNII-Ideas 123/2011 project was conducted in a total of 36 patients over the 2011-2016 period. After imaging they were suspected of pancreatic cancer and hospitalized in the Surgical Clinic no 4 of the Emergency University Hospital of Bucharest. From the initial 36 patients one was diagnosed with a primary colon tumor with pancreatic invasion and one with acute pancreatitis, and thus were excluded from the study. The vast majority



of patients diagnosed where in stage 4 of the disease, presenting numerous metastases. Because of this, the number of patients receiving curative treatment was very low, with 8 out of 34 patients in the study.

Blood samples were collected from all patients for CEA and CA19-9 electrochemical testing on a stochastic sensor and for ELISA testing.

In our study, ELISA assays for CA 19-9 were performed according to the manufacturer's instructions with minor modifications. The CA 19-9 samples were tested both in the Emergency University Hospital of Bucharest and in other laboratories outside the hospital, when the deposits were insufficient in the hospital lab. ROCHE analyzers and ELISA kits were used on 96-well plates.

Molecular detection of CA 19-9 from whole blood samples was performed using the tools used for molecular recognition. These devices are platforms based on nanostructured materials such as Mangan (III) complex with meso-tetra (4-carboxyphenyl) porphyrin and maltodextrin (dextrose equivalence between 4 and 7), in diamond paste, graphite paste or C60 fullerene paste. CA 19-9 identification in blood samples at the molecular level is performed using the stochastic mode and is followed by quantification of it using stochastic and voltametric differential pulse modes. CA 19-9 can be identified in very low concentration ranges using the stochastic mode. This makes early detection of cancers, such as gastrointestinal and pancreatic cancer, possible.

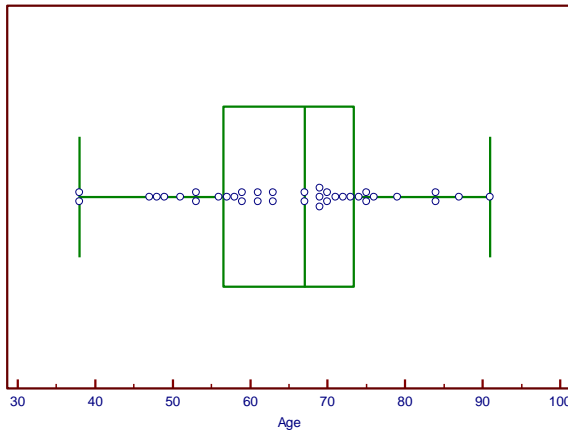
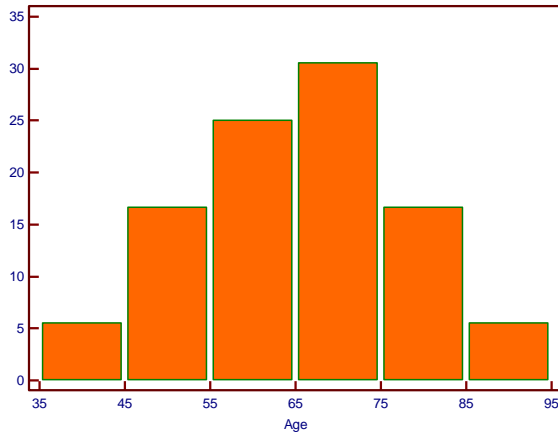
The high sensitivity and reliability recommend these tools for molecular screening.

Immunohistochemistry - For each diagnostic sample (resection sample or biopsy), a representative block based on hematoxylin-eosin staining for immunohistochemistry is selected. It is stained with a panel made up of up to 38 antibodies, of which 27 were finally considered for analysis after the missing data was removed. These are all conventional antibodies widely used, including markers for intermediate filaments (CK5-cytokeratin 5, CK7, CK17, CK18, CK19, CK20, vimentin) [18] and mucins (MUC1- cell surface associated, MUC2, MUC5, MUC6) [19] are commonly used to differentiate between different types of epithelium (e.g., squamous, glandular) and subtypes (e.g., glandular and pancreatobiliary); common markers expressed in adenocarcinomas of gastrointestinal and pancreatic origin (BerEP4, EMA- epithelial membrane antigen, CEA monoclonal [20], polyclonal CEA, CA19-9, CA125 [21], maspin [22]; intestinal transcription factor CDX2, tumor suppressor proteins [23] (p53, SMAD4), Ki67 proliferation marker, p63 for differentiation of squamous cells, neuroendocrine marker chromogranin A, CD10 for microvilli / brush stain, CD56 marker, WT1 protein whose expression has been described in a variety of tumor types [24].

Immunoreactivity is assessed quantitatively by pathologists by visual examination of the entire section and is recorded using a continuous numeric score (from 1 to 100) based on the percentage of colored tumor cells [25,26].

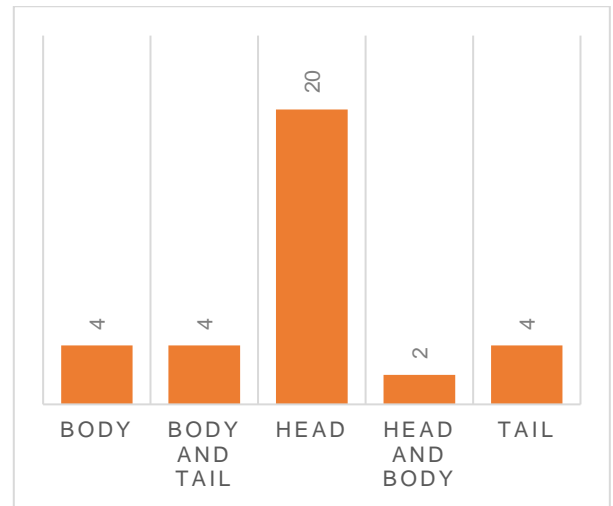
**Results**

The population sample was made up of 15 females and 19 men. The mean age was 65 years (ranging from 38 to 91), with a standard deviation of 11.85 years (Figure 1).

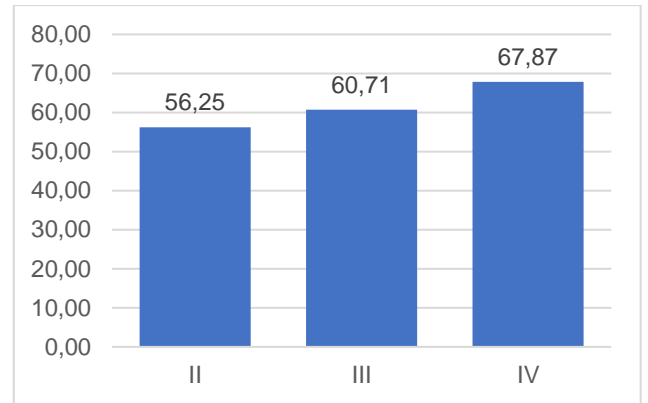


**Figure 1- Age distribution of the population sample**

The majority of the tumors were localized in the pancreatic head. The exact distribution is presented in figure 2. The stage of the cancer at diagnosis was: stage IV for 23 patients, stage III for 7 patients and stage II for 4 patients. No patient was diagnosed with stage I cancer. The age of diagnosis was correlated with a later stage of the cancer (Figure 3).



**Figure 2- tumor localization distribution**

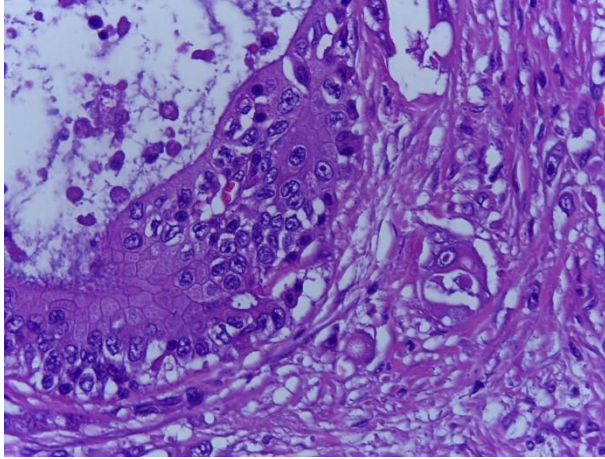


**Figure 3- average age by cancer stage**

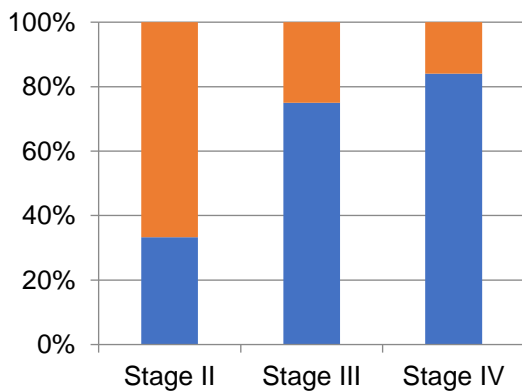
As anatomopathological tumor type, pancreatic adenocarcinoma predominated in the studied group, there were 29 patients with adenocarcinomas (figure 4); 4 patients with pancreatic carcinomas and 1 patient with a neuroendocrine tumor.

In this pilot trial, the CA 19-9 pivot ELISA values were positive in 28 cases, with values ranging from 38.3 to 88.34 U / ml, and in 8 cases the values were below 37 U / ml, although 4 patients were in the 4th stage of the disease (Figure 4). The lowest level of 2 U/ml was detected in a stage IV patient.

There was a positive correlation between the stage of the cancer and ki-67 coefficient. For the stage II the average of ki-67 coefficient was 16.25%, for stage III was 37.14% and for stage IV was 45.65%.



**Figure 4 - Moderately differentiated adenocarcinoma exocrine pancreas, with superinfected secretion (top left) and invasion by contiguity (bottom right), in the desmoid stroma; hematoxylin – eosin staining 400x**



**Figure 5 - Patient distribution in CA 19-9 fusions by ELISA and tumor stage**

**Discussions**

While our study was of a limited size and had a bias towards stage IV cases, it is in line with

the aggressiveness of pancreatic cancer, as the majority of cases are diagnosed in late stages. We can draw parallels between our results and the results of other similar studies on different populations.

A meta-analysis of CA 19-9 utility in pancreatic cancer has reported a sensibility of 78.2% and a specificity of 82.8% [27]. This is in line with our distribution of CA 19-9 levels by cancer stage.

While CA 19-9 is expressed non-specific in several benign and malignant diseases, has false negative results in Lewis negative genotype (5-10% of the population) and in presence of obstructive jaundice has increased false positive results, it is still the extensively studied and validated serum biomarker for the diagnosis of pancreatic cancer in symptomatic patients [28].

**Conclusions**

It is a time when medicine is concentrated on personalized medicine. Our project thus wants to add another tool of early detection: a molecular diagnosis technique that could be used in screening. Our present study is one of the first steps needed to develop it. It confirms the reliability of CA-19-9 as a pancreatic cancer biomarker and emphasizes the need of a faster, cheaper test, with increased sensibility. We believe that serum stochastic sensors are the way to respond to that need.

## References

- [1]R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62:10–29. doi: 10.3322/caac.20138.
- [2]Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Ann Oncol.* 2014;25: 1650–1656.
- [3]<http://www.mymed.ro/noiembrie-luna-dedicata-constientizarii-cancerului-de-pancreas.html>
- [4]<http://www.un.org/en/index.html>
- [5]Kohei Nishio,<sup>1</sup> Kenjiro Kimura, <sup>1</sup> Ryosuke Amano,<sup>1</sup> Sadaaki Yamazoe,<sup>1</sup> Go Ohnira,<sup>1</sup> Bunzo Nakata,<sup>2</sup> Kosei Hirakawa,<sup>1</sup> and Masaichi Ohira<sup>1</sup>- Preoperative predictors for early recurrence of resectable pancreatic cancer- *World J Surg Oncol.* 2017; 15: 16./ Published online 2017 Jan 10. doi: 10.1186/s12957-016-1078-z;
- [6]Kimura K, Amano R, Nakata B, Yamazoe S, Hirata K, Murata A, Miura K, Nishio K, Hirakawa T, Ohira M, Hirakawa K. Clinical and pathological features of five-year survivors after pancreatectomy for pancreatic adenocarcinoma. *World J Surg Oncol.* 2014;12:360. doi: 10.1186/1477-7819-12-360.
- [7]Qian Dong<sup>1</sup>, Xiang-hong Yang<sup>2</sup>, <sup>6</sup>Email author, ,Yao Zhang<sup>3</sup>, ,Wei Jing<sup>1</sup>, Li-qiang Zheng<sup>4</sup>, Yun-peng Liu<sup>5</sup> and Xiu-juan Qu<sup>5</sup>; Elevated serum CA19-9 level is a promising predictor for poor prognosis in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma: a pilot study - *World Journal of Surgical Oncology*2014; 12:171
- [8]Pannala R, Basu A, Petersen GM, Chari ST: New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. *Lancet Oncol.* 2009, 10: 88-95. 10.1016/S1470-2045(08)70337-1.
- [9]Qian Dong, Xiang-hong Yang, Yao Zhang ,Wei Jing, Li-qiang Zheng, Yun-peng Liu and Xiu-juan Qu: Elevated serum CA19-9 level is a promising predictor for poor prognosis in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma: a pilot study; *World Journal of Surgical Oncology* 2014; 12:171
- [10]Ching-Wei D. Tzeng, MD,<sup>1</sup> Andrey Frolov, MD, PhD,<sup>1</sup> Natalya Frolova, MD,<sup>2</sup> Nirag C. Jhala, MD,<sup>2</sup> J. Harrison Howard, MD,<sup>1</sup> Selwyn M. Vickers, MD,<sup>3</sup> Donald J. Buchsbaum, PhD,<sup>4</sup> Martin J. Heslin, MD,<sup>1</sup> and J. Pablo Arnoletti, MD<sup>1</sup>, Pancreatic Cancer Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Intron 1 Polymorphism Influences Postoperative Patient Survival and in vitro Erlotinib Response; *Annals of Surgical Oncology* 14(2007):2150–2158.
- [11]Ji-Cong Gui,Wei-Li Yan,Xing-Dang Liu, CA19-9 and CA242 as tumor markers for the diagnosis of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Clinical and Experimental medicine*, May 2014, Volume 14, Issue 2, pp 225–233
- [12]<http://www.mymed.ro/markeri-tumoral.html>
- [13] Edge SB, Byrd DR, Compton CC, editors. *AJCC Cancer Staging Manual.* 7th ed. New York: Springer; 2010.
- [14] Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. *TNM Classification of Malignant Tumours.* 7th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2009.
- [15]LAMPS, Misdraji, Yerian, Deshpande, Kim Kakar, Mino-Kenudson, Wang Yeh, Karadine; *Diagnostic Pathology Hepatobiliary &Pancreas, Sectione 5, Tumors of the Pancreas, AMIRSYS,* 2011, pp II-5-2 --- II -5- 58.
- [16]L.A. Torre, F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal *Global cancer statistics, 2012; CA Cancer J Clin,* 65 (2015), pp. 87-108
- [17]R.L. Siegel, K.D. Miller , A. Jemal *Cancer statistics, 2015; CA Cancer J Clin,* 65 (2015), pp. 5-29
- [18]Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology.*

- 2002;40: 403–439. doi: 10.1046/j.1365-2559.2002.01387.
- [19]Yonezawa S, Higashi M, Yamada N, Yokoyama S, Goto M. Significance of mucin expression in pancreatobiliary neoplasms. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2010;17: 108–24. doi: 10.1007/s00534-009-0174-7
- [20]Hornick JL, Lauwers GY, Odze RD. Immunohistochemistry can help distinguish metastatic pancreatic adenocarcinomas from bile duct adenomas and hamartomas of the liver. *Am J Surg Pathol.* 2005;29: 381–9. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15725808>
- [21]Einama T, Kamachi H, Nishihara H, Homma S, Kanno H, Takahashi K, et al. Co-Expression of Mesothelin and CA125 Correlates With Unfavorable Patient Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas.* 2011;40: 1276–1282. doi: 10.1097/MPA.0b013e318221bed8
- [22]Cao D, Zhang Q, Wu LS-F, Salaria SN, Winter JW, Hruban RH, et al. Prognostic significance of maspin in pancreatic ductal adenocarcinoma: tissue microarray analysis of 223 surgically resected cases. *Mod Pathol.* 2007;20: 570–8. doi: 10.1038/modpathol.3800772
- [23]Oshima M, Okano K, Muraki S, Haba R, Maeba T, Suzuki Y, et al. Immunohistochemically detected expression of 3 major genes (CDKN2A/p16, TP53, and SMAD4/DPC4) strongly predicts survival in patients with resectable pancreatic cancer. *Ann Surg.* 2013;258: 336–46. doi: 10.1097/SLA.0b013e3182827a65
- [24]Nakatsuka S, Oji Y, Horiuchi T, Kanda T, Kitagawa M, Takeuchi T, et al. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Mod Pathol.* 2006;19: 804–814. doi: 10.1038/modpathol.3800588
- [25] Rizzardi AE, Johnson AT, Isaksson Vogel R, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, et al. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagn Pathol.* 2012;7: 42 doi: 10.1186/1746-1596-7-42 [PMC free article] [PubMed]
- [26]Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue—a review. *Diagn Pathol.* 2014;9: 221 doi: 10.1186/s13000-014-0221-9
- [27]Poruk KE, Gay DZ, Brown K, et al. The Clinical Utility of CA 19-9 in Pancreatic Adenocarcinoma: Diagnostic and Prognostic Updates. *Current molecular medicine.* 2013;13(3):340-351.
- [28]Ballehaninna UK, Chamberlain RS. Serum CA 19-9 as a Biomarker for Pancreatic Cancer—A Comprehensive Review. *Indian journal of surgical oncology.* 2011;2(2):88-100. doi:10.1007/s13193-011-0042-1.

