

VODIČI ZA PRIMENU TUMORSKIH MARKERA KOD DUKTALNOG ADENOKARCINOMA PANKREASA

GUIDELINES FOR THE USE OF TUMOR MARKERS IN PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA

Marijana Dajak¹, Nada Majkić-Singh²

¹Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije, Beograd

²Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije i Farmaceutski fakultet, Beograd

Kratak sadržaj: Pankreasni duktalni adenokarcinom je četvrti vodeći uzrok smrti prouzrokovanih kancerom i samo 2–3% pacijenata prežive 5 godina posle dijagnoze kancera pankreasa. CA 19-9 je još uvek trenutni standardni serumski tumorski marker za pankreasni adenokarcinom i u odnosu na njega se upoređuju drugi tumorski markeri. CA 19-9 je tumorski marker sa prihvatljivom kliničkom primenom kod pankreasnog kancera, ali ne postoje specifične preporuke za njegovu upotrebu u *screening-u*, dijagnozi i prognozi. Serijsko određivanje CA 19-9 za vreme palijativne hemioterapije se može koristiti zajedno sa *imaging* testovima za utvrđivanje odgovora. Drugi tumorski markeri sa prihvatljivom kliničkom primenom su tkivni markeri pankreasnog kancera kao što su citokeratini, mucini i SMAD4 tumorski supresorni gen. Jedini izlečivi tretman za pankreasni kancer je hirurgija sa kompletnim uklanjanjem tumora. Međutim, samo 5–15% se otkrivaju dovoljno rano da dopuštaju radikalnu resekciju. Dodatni markeri su potrebni ne samo da olakšaju ranu dijagnozu pankreasnog kancera, već takođe i da pomognu dijagnostikovanju prekurzorih lezija pankreasnog kancera. Postoji trenutno mnogo markera pod ispitivanjem kao što su: CA 242, CAM 17.1 i tkivni polipeptidni specifični antigen (TPS). Klinička primena MIC-1, osteopontina, TIMP-1 i serumskih proteomik markera je još uvek u fazi istraživanja ili otkrivanja. Mutacije gena i metilacija DNK u pankreasnom soku se takođe ispituju kao potencijalni markeri pankreasnog kancera.

Ključne reči: pankreasni kancer, CA 19-9, tumorski markeri, vodiči

Uvod

Kancer pankreasa ima lošu prognozu sa stopom mortaliteta većom od 99%. Jedini izlečivi tretman za pankreasni kancer je hirurška operacija kojom se kompletno uklanja tumor. Međutim, samo kod 5–15% slučajeva, kancer se otkriva u ranoj fazi gde je

Summary: Pancreatic ductal adenocarcinoma is the fourth leading cause of cancer death, and only 2–3% of patients surviving 5 years after a diagnosis of pancreatic cancer. CA 19-9 is still the current standard serum tumor marker for pancreatic adenocarcinoma, and the one against which others are compared. CA 19-9 is tumor marker with accepted clinical use in pancreatic cancer, but there are no specific recommendations for its use in screening, diagnosis and prognosis. Serial CA 19-9 measurement during palliative chemotherapy can be used in conjunction with imaging tests to determine response. Other tumor markers of accepted clinical use are tissue markers of pancreatic cancer such as cytokeratins, mucins and SMAD4 tumor suppressor gene. The only curative treatment of pancreatic cancer is surgery with complete removal of tumor. However, only 5–15% of tumors are detected early enough to allow radical resection. Additional markers are needed not only to facilitate the early diagnosis of pancreatic cancer, but also to help diagnose pancreatic cancer precursor lesions. There are currently many markers under investigation such as CA 242, CAM 17.1 and tissue polypeptide specific antigen (TPS). Clinical use of MIC-1, osteopontin, TIMP-1 and serum proteomic markers is still in the research or discovery stage. The gene mutation and DNK methylation in pancreatic juice are also evaluated as potential markers of pancreatic cancer.

Keywords: pancreatic cancer, CA 19-9, tumor markers, guidelines

moguća radikalna resekcija. Životni rizik za razvoj kancera pankreasa je približno 1/150, a uglavnom se dijagnostikuje u srednjim šezdesetim godinama. Međutim, do pedesete godine života, godišnja incidencija kancera pankreasa je niska, manja je od 10 slučajeva na 100 000 u opštoj populaciji (1).

Na dijagnozu kancera pankreasa se obično posumnja kod pacijenata sa progresivnom obstruktivnom žuticom, velikim gubitkom u telesnoj težini i sa bolom u predelu abdomena ili na sredini leđa. Hronični pankreatitis se teško može razlikovati od pankreasnog kancera primenom kliničkih, *imaging* i biohemijskih parametara. Kod pacijenta sa kancerom pankreasa je retko prisutan *diabetes mellitus*, tromboflebitis, depresija ili dokaz metastatske bolesti. Generalno, dijagnoza se uspostavlja primenom kompjuterizovane tomografije (CT, *computerized tomography*), endoskopskog ultrazvuka (EUS, *endoscopic ultrasound*) ili endoskopske retrogradne holangiopankreatografije (ERCP, *endoscopic retrograde cholangiopancreatography*) uz histološku (ili citološku) potvrdu. Ako se razmatra izlečiva resekcija, vrši se ispitivanje stadijuma primenom EUS ili angiografije, radi traženja dokaza metastaza u limfnim čvorovima, peritoneumu, jetri i vaskularnoj invaziji splenične ili portalne vene. Spiralni CT sa kontrastom obično obezbeđuje dobru vizualizaciju peripankreasne vaskulature bez potrebe za formalnom angiografijom. Sa dijagnozom kancera pankreasa se može zakasnuti kod nekih pacijenata zbog različitih razloga kao što su: nespecifični simptomi, kancer koji je mali ili koji difuzno infiltrira pankreas bez formiranja mase, odlaganje korišćenja dijagnostičkih usluga kao što su endoskopski ultrazvuk ili aspiracija tankom iglom (FNA, *fine needle aspiration*), ili zbog suboptimalne osetljivosti citologije FNA aspirata (2). *Imaging* i endoskopija se odmah mogu upotrebiti za dijagnozu neresektabilnih lezija, ali su manje efektivne za dijagnozu malih, hirurški resektabilnih kancera.

Praćenje duktalnih adenokarcinoma pankreasa zavisi od nekoliko faktora koji uključuju: simptome, postojeći status pacijenta, histološku klasifikaciju kancera, stupanj bolesti i prisustvo komplikacija. Hirurška intervencija (*Whipple*-ova resekcija za tumore glave pankreasa) ostaje jedini realni izlečivi modalitet za kancer pankreasa. *Whipple*-ova procedura uključuje resekciju: glave pankreasa, duodenuma, distalnog žučnog kanala, lokalnih limfnih čvorova i peripankreasnog tkiva. Stopa mortaliteta posle operacije prilično varira u zavisnosti od iskustva hirurga i broja pacijenata rukovođenih od strane institucija; ali uglavnom je niska (1–3%). Nažalost, približno 75% pojedinaca koji su tretirani *Whipple*-ovim operacijama umreće od svojih bolesti u narednih 5 godina, sa medijanom preživljavanja od približno 18 meseci. Mnogim pacijentima, kod kojih je urađena izlečiva resekcija pankreasnog adenokarcinoma se nudi adjuvantna ili neohemioradioterapija. Skorašnje kontraverzne studije ukazuju da radioterapija možda nije efektivna za većinu pacijenata (3). Prekarcinogene lezije se takođe mogu prikazati sa simptomima i mogu se pojaviti kao pankreasne čvrste i cistične mase uključujući intraduktalne papilarne mukozne neoplazme (IPMN). Važno je dijagnostikovati ove neoplazme koje se mogu manifestovati na isti način kao invazivni pankreasni kanceri jer su obično izlečive primenom hirurgije.

Postoji nekoliko hemioterapeutskih agenasa koji su aktivni u slučaju pankreasnog kancera (4). Agensi kao što su gemcitabin i 5-fluorouracil (5FU) su efektivni kod samo 10–20% pacijenata sa ovom bolešću. Drugi ispitivani hemioterapeutici su: slični lekovi sa 5FU (kapecitabin i S-1), rubitecan (9-nitrokamptotecin, RFS 2000) i taksoter. Ispitani su brojni eksperimentalni pristupi, uključujući i tumorske vakcine, ali njihova efikasnost tek treba da se ustanovi.

Pošto će većina pacijenata umreti, važno je poboljšati kvalitet života što je više moguće. Mere za ublažavanje bola su neophodne i obično se daju opijatni analgetici u formi infuzionih pumpi. Destrukcija nerava oko pankreasa («nervni blok celijačnog aksisa») se postiže perkutanom, EUS-vođenom ili intraoperativnom injekcijom 100% alkohola, koja obezbeđuje olakšanje bola za mnoge pacijente (5). Takođe, primenom stentovanja glavnog pankreasnog kanala takođe je pokušano da se smanji bol od povećanog intraduktalnog pritiska. Gubitak telesne težine je uobičajeni problem koji je obično posledica više faktora i često je otporan na tretman. Anoreksija, maldigestija i kaheksija su važni faktori. Pankreasni enzimi i stimulatori apetita su od pomoći. Od brojnih agenasa isprobanih u suzbijanju kaheksije, riblja ulja izgleda daju rezultate i smatra se da blokiraju efekte kancera na trošenje mišićne mase i masti (6).

Mnogi pacijenti sa kancerom pankreasa umreće od komplikacija klasične obstrukcije žučnog kanala. Žučna drenaža može smanjiti simptome i postiže se ugradnjom žučnih stentova u toku ERCP ili perkutanom transhepatičnom holangiografijom (PTC). Žučni stentovi mogu biti postavljeni procedurom «van pacijenta» sa minimalnim uznemiravanjem pacijenta. Na žalost, ovi stentovi često budu blokirani zbog progresivnog rasta tumora, pa je neophodno njihovo uklanjanje ili zamena.

Pošto 15–40% pacijenata sa resektabilnim kancerom pankreasa preživi 5 godina posle hirurške resekcije, ranija dijagnoza kancera pankreasa može spasiti život. Zaista, Canto i sar. su pokazali da na EUS zasnovan *screening* pojedinaca, čija porodična istorija ukazuje da imaju povećan rizik za razvoj pankreasnog kancera, može rano otkriti (neinvasivne) pankreasne neoplazme (7). Uloga *screening*-a primenom *imaging* testova se još uvek ispituje. Međutim, *screening* primenom EUS i spiralne CT (u kontekstu savetovanja o riziku za nastanak kancera i nasledne predispozicije) izgleda da je efektivan za otkrivanje, tretiranje i verovatno lečenje ranih pankreasnih kancera i prekancerogenih lezija (IPMN), mada se ova informacija zasniva na relativno malom broju ispitanika. Potencijalni kandidati za *screening* uključuju pojedince koji imaju više najbližih rođaka sa familijarnim kancerom pankreasa, pojedince sa mutacijama germalne linije BRCA2 gena, STK11 gena (koji imaju *Peutz-Jeghers*-ov sindrom) ili p16 gena (sa familijarnim atipičnim sindromom melanoma mladeža), i pojedince sa naslednim pankreatitisom usled mutacija

germalne linije u katjonskom tripsinogen genu (8). Trenutno, *screening* bi trebalo razmotriti samo kod pojedinaca sa značajno povećanim rizikom za razvoj pankreasnih neoplazmi i samo u kontekstu protokola kliničkih istraživanja.

Bolji serumski markeri pankreasnog kancera su hitno potrebni za poboljšanje dijagnoze kancera pankreasa. Postojeći tumorski markeri nisu dovoljno osetljivi ni specifični da razlikuju benignu od maligne bolesti.

Tumorski markeri kod kancera pankreasa: NACB preporuke

U *Tabeli 1* dat je pregled preporuka Nacionalne akademije za kliničku biohemiju (NACB, *National Academy of Clinical Biochemistry*) za primenu CA 19-9 kod kancera pankreasa, uporedo sa preporukama Evropske grupe za tumorske markere (EGTM, *European Group on Tumor Markers*) i Američkog gastroenterološkog udruženja (AGA, *American Gastroenterological Association*). NACB vodiči proističu iz objavljenih studija o serumskim i tkivnim markerima za pankreasni kancer koji su opisani u daljem tekstu.

Sistem koji je primenjen za gradiranje nivoa dokaza (LOE, *level of evidence*) se zasniva na onom koji su preporučili Hayes i sar. (9):

- I – dokaz iz dobro vođenih prospektivnih kontrolisanih studija ili *pool*-ovanih ili meta analiza ili studija nivoa II ili III;
- II – dokaz markera određen za vreme prospektivnog terapijskog ispitivanja;
- III – dokaz iz velikih prospektivnih studija;
- IV – dokaz iz malih retrospektivnih studija;
- V – dokaz iz malih pilotskih studija.

Najveće ograničenje većine studija o serumskim markerima je da one ne uspevaju da ograniče svoje analize na pacijente sa malim potencijalno izlečivim pankreasnim kancerima.

Tumorski markeri ispitivani za primenu kod kancera pankreasa

Predhodno ispitivani markeri za koje se pokazalo da su inferiorni u odnosu na trenutno standardni marker, CA19-9, su sledeći: amilin (IAPP, *islet amyloid polypeptide*); ugljenohidratni antigeni CA 50 i CA

Tabela 1 Preporuke za primenu CA 19-9 kao tumorskog markera kancera pankreasa.

Primena	EGTM 1999 (74)	AGA 1999 (3)	NACB 2005	LOE (NACB)
<i>Screening</i>	Nema specifičnih preporuka.	Ne postoji specifična metoda <i>screening</i> -a koja se preporučuje za osobe sa visokim rizikom; najbolja strategija je možda CT/EUS i CA 19-9. Klinička korist nije dokazana.	Nije za <i>screening</i> opšte populacije. CA 19-9 je često normalan kod osoba sa visokim rizikom sa jakom porodičnom istorijom pankreasnog kancera koji su prošli kroz EUS/CT <i>screening</i> pankreasa.	III
Dijagnoza	Služi kao pomoć u dijagnozi pankreasnih maligniteta, ali sa ograničenom vrednošću, naročito u ranim stadijumima i u prisustvuolestaze.	Nema specifičnih preporuka.	Ako se koristi, CA 19-9 bi trebalo da se koristi zajedno sa nekim <i>imaging</i> testom (CT, EUS). Odgovarajuće interpretirane vrednosti CA19-9 mogu voditi daljem invazivnom testiranju (ERCP, EUS FNA, laparoskopija, laparotomija) u odgovarajućem kliničkom kontekstu.	I
Prognoza	Ima primenu u rutini za prognostičke svrhe, ali to nije potvrđeno.	Nema specifičnih preporuka.	Ima nezavisnu prognostičku vrednost u pogledu na resektabilnost i preživljavanje. Kliničke odluke treba da se zasnivaju na svim dostupnim informacijama.	I
<i>Monitoring</i>	Ima primenu u rutini za praćenje, ali to nije potvrđeno.	Nije prihvaćeni test za antitumorsku efikasnost.	Serijsko određivanje u toku paliativne hemioterapije može da se koristi zajedno sa <i>imaging</i> testovima za utvrđivanje odgovora. Serijska određivanja se preporučuju za praćenje posle potencijalno izlečive hirurške intervencije.	I

CT (kompjuterizovana tomografija), ERCP (endoskopska retrogradna holangiopankreatigrafija), EUS (endoskopski ultrazvuk), FNA (*fine needle aspirat*), LOE (level of evidence)

195; tumoru udruženi tripsin inhibitor (TATI, *tumor associated trypsin inhibitor*), tumorska M2 piruvat kinaza (TUM2-PK), pankreasni onkofetalni antigen (POA), YKL-40 (glikoprotein iz familije hitinaza) i HIP/PAP (hepatokarcinom-intestinum-pankreas/pankreatitis udruženi protein). Markeri za koje postoje konfliktni dokazi što se tiče njihovog dijagnostičkog potencijala su: karcinoembriogeni antigen (CEA), CA 72-4 i mucini DU-PAN-2 i Span-1 (10–19).

Glikoprotein CEA je normalno prisutan u jetri, pankreasu i gastrointestinalnom traktu u toku fetalnog života, a kod odraslih u malim količinama u kolonu i u endodermalnom tkivu. Kod pušača vrednosti CEA mogu biti lažno povišene, kao i kod različitih benignih bolesti kao što su bolesti jetre, ekstrahepatična holestaza i infarkt miokarda. CEA je bio više od deset godina jedini serumski tumorski marker koji se klinički koristio u dijagnozi pankreasnog kancera. Osetljivost (16–92%) i specifičnost (49–93%) za *cutoff* vrednost od 5 µg/L u dijagnozi su veoma varirale i većina studija je pokazala da je nivo osetljivosti neprihvatljivo nizak za kliničku primenu.

POA je glikoprotein razvijen imunizacijom zečeva sa ekstraktom humanog fetalnog pankreasa. Njegovo određivanje je veoma teško standardizovati. Povišene vrednosti u serumu pronađene su kod 15–35% pacijenata sa gastrointestinalnim kancerima i kod 17–97% pacijenata sa pankreasnim kancerom. Kao takav, POA teško može imati mesto u ranoj dijagnozi kancera pankreasa.

Za enzimski protein TATI je pokazano da je identičan sa pankreasnim sekretornim tripsin inhibitorom. U dijagnozi pankreasnog kancera dobijena je osetljivost čak do 85–95% za TATI, ali je problem niska specifičnost.

CA 50 je definisan sa monoklonskim antitelom C 50 razvijenim protiv ćelijske linije kolorektalnog kancera, COLO 205. Povišene koncentracije u serumu originalno se nalaze kod velikog broja pacijenata sa gastrointestinalnim karcinomima. Frekvencija povišenih vrednosti CA 50 u serumu varira od 13% do 91% kod različitih malignih bolesti. Povišena vrednost nađene su kod 65–95% pacijenata sa kancerom pankreasa. Proizvođači testova za CA 50 preporučuju *cutoff* od 17 kU/L koja se zasniva na podacima od zdravih davaoca krvi. Osetljivost od 77% i specifičnost od 84% su objavljene uz znatno viši nivo *cutoff* – 137 kU/L.

CA 195 je definisan sa monoklonskim antitelom CC3C165 (IgM tip), koje je dobijeno imunizacijom miševa preparatom membrane iz jetrenih metastaza humanog kancera kolona. Analiza epitopa je pokazala da se ovo antitelo vezuje za sialilizovan Lewis-ov antigen, kao i monoklonsko antitelo C19-9, ali takođe i za sam Lewis-ov glikolipidni antigen. Objavljene vrednosti za osetljivost (69–89%) i specifičnost (52–92%) za CA 195 za dijagnozu pankreasnog kancera su vrlo slične onima za CA 242.

DU-PAN je monoklonsko antitelo razvijeno imunizacijom sa ćelijskom linijom humanog pankreasnog adenokarcinoma koje prepoznaje antigen na mucinu sličnom glikoproteinu. Ovaj antigen je otkriven u ductalnom epitelijumu fetalnog pankreasa kao i u normalnom pankreasu odraslih i normalnom bilijarnom epitelijumu, ali takođe i kod pankreasnih adenokarcinoma. Povišene vrednosti DU-PAN-2 u serumu su prisutne kod 59% pacijenata sa benignim hepatobilijarnim bolestima, kod 44–50% pacijenata sa hepatomom, kod 40–62% pacijenata sa bilijarnim kancerom i kod 19–28% pacijenata sa kancerom želuca. Objavljena dijagnostička osetljivost serumskog DU-PAN-2 u kombinaciji sa CA 19-9 u dijagnozi pankreasnog kancera je 95%. Pokazano je da stvarni epitop DU-PAN-2 je LST (sialilat-N-tetraoza), prekurzor CA 19-9. LST je pronađen kod pacijenata sa Lewis negativnim fenotipom; na ovaj način DU-PAN-2 možda ima dopunsku ulogu kod Lewis negativnih i CA 19-9 negativnih pojedinaca kod kojih se sumnja da imaju pankreasni kancer.

Span-1 je monoklonsko antitelo dobijeno imunizacijom ćelijske linije (SW 1990) humanog pankreasnog kancera, koje reaguje sa sialilinisanim mucinskim epitopom slične strukture CA 19-9. Pokazano je da je dijagnostička osetljivost (78–93%) za Span-1 u serološkoj dijagnozi pankreasnog kancera viša od one za DU-PAN-2 (49–87%). Nivoi specifičnosti značajno variraju (20).

U ovom radu, trenutno preporučeni tumorski markeri su klasifikovani prema dokazu raspoloživom da potvrdi njihovu kliničku upotrebu. Za markere u kategoriji A, »priznata klinička primena«, postoji jasan dokaz da je marker klinički koristan, da doprinosi nezi pacijenta i da je njegova upotreba široko prihvaćena. Za one u kategoriji B, »procena«, postoji značajna informacija za marker, koja tipično proističe iz većih studija koje validuju njegove dijagnostičke performanse, ali ne postoji još uvek jasan dokaz da je marker klinički koristan. Za markere u kategoriji C, »ispitivanje ili pronalaženje«, objavljeni su samo početni, u fazi otkrivanja, podaci; dalja evaluacija u većim grupama je neophodna za utvrđivanje dijagnostičkog potencijala.

Tumorski markeri sa priznatom kliničkom primenom kod pankreasnog kancera (kategorija A)

Ugljenohidratni antigen, odnosno karcinom antigen 19-9 (CA 19-9) je definisan sa mišjim monoklonskim antitelom 1116NS19-9 (IgG1), razvijenog protiv ćelijske linije SW1116 humanog karcinoma kolona. Njegov epitop je sialilizovani antigen Lewis^a antigenove krvne grupe i u serumu je udružen sa mucinom. CA 19-9 je još uvek trenutni standardni serumski tumorski marker za pankreasni adenokarcinom i u odnosu na njega se upoređuju

drugi tumorski markeri. Preporuke koje se odnose na njegovu primenu u rukovođenju pacijenata sa kancerom pankreasa su izdate od strane EGTM i AGA (1, 21). Klinička korisnost CA 19-9 u *screening-u*, dijagnozi, prognozi i praćenju terapije za pankreasni adenokarcinom je data u *Tabeli 1*. Američka administracija za hranu i lekove (FDA, *Food and Drug Administration*) je odobrila nekoliko metoda za određivanja CA 19-9 u cilju praćenja pacijenata sa pankreasnim kancerom.

Dijagnoza. Korisnost CA 19-9 u serumu za dijagnozu pankreasnog adenokarcinoma je opsežno ispitivana u brojnim retrospektivnim i prospektivnim studijama koje su obuhvatile brojne kontrolne grupe: pacijente sa hroničnim pankreatitisom, bolestima bijarnog trakta (obstruktivna žutica), abdominalnim bolom i zdrave osobe (22). *Cutoff* vrednost od 37 kU/L se smatra da je najtačnija i preporučuje se za razlikovanje pankreasnog kancera od benignih bolesti pankreasa. Vrednosti za osetljivost i specifičnost za CA 19-9 variraju u zavisnosti od ispitivane populacije. Meta-analiza sličnih studija pokazala je da CA 19-9 u serumu ima srednju osetljivost od 81% (opseg 69–93%), i specifičnost od 91% (opseg 76–99%) za *cutoff* vrednost od 37 kU/L. Više *cutoff* vrednosti povećavaju dijagnostičku specifičnost: za *cutoff* vrednost od 100 kU/L, pokazana je dijagnostička specifičnost od 97%, a za nivoe CA 19-9 preko 1000 kU/L specifičnost dostiže 100% (23). Korisnost CA 19-9 se poboljšava sa napredovanjem pankreasnog kancera (16). Sledstveno tome, za male tumore (manje od 3 cm), osetljivost CA 19-9 se značajno smanjuje (približno na 55%). Sekretija CA 19-9 antigena zavisi od statusa Lewisovog antigena. Ako se ovaj status uzme u obzir, dijagnostička osetljivost CA 19-9 može dostići vrednost od 92% kod pacijenta sa simptomima kancera pankreasa (24). Kombinacija CA 19-9 u serumu i *imaging* testova (sonografija, CT) povećava pozitivnu prediktivnu vrednost. Nažalost, trenutno, izlečenje od pankreasnog dukalnog adenokarcinoma je povezana sa stadijumom i veličinom tumora, tako da izazov u primeni serumskih tumorskih markera, kao što je CA 19-9, nije da se oni adekvatno određuju kod pacijenata sa uznapredovalom bolešću koja se retko može izlečiti, već da se obezbedi da se pacijenti sa malim izlečivim kancerima na vreme identifikuju uz pomoć tačnih serumskih tumorskih markera. Serumski CA 19-9 nema neophodne karakteristike da udovolji ovom izazovu.

Druga ograničenja dijagnostičke korisnosti CA 19-9 uključuju njegove povišene vrednosti kod nepankreasnih gastrointestinalnih maligniteta kao i kod različitih benignih bolesti. Bilijarna opstrukcija, holecistitis, holangitis, hepatična ciroza, akutni i hronični pankreatitis su česti uzroci povišenih vrednosti CA 19-9 (22). Kod akutnog i hroničnog pankreatitisa povišeni nivoi CA 19-9 u serumu su kod 4–23% slučajeva. CA 19-9 u serumu kod pacijenata sa akutnim holangitisom koji je posledica bilijarne

opstrukcije žučnim kamencima, može dostići vrednost i od nekoliko hiljada kU/L (25).

Uzimajući u obzir ova ograničenja NACB grupa ne preporučuje merenje CA 19-9 u serumu za dijagnozu kancera pankreasa. Vodiči EGTM preporučuju ograničenu ulogu CA 19-9 u dijagnozi pankreasnog tumora kao dopunu tačnim pankreasnim *imaging* procedurama (1, 21). Ako se meri, CA 19-9 bi trebalo da se koristi zajedno sa nekim *imaging* testom (CT, EUS). Odgovarajuće interpretirane vrednosti CA 19-9 mogu voditi daljem invanzivnom testiranju (ERCP, EUS FNA, laparoskopiji, laparotomiji) u pogodnom kliničkom kontekstu.

Screening. Niska prevalencija pankreasnog kancera u opštoj populaciji znači da *screening* asimptomatičnih osoba za otkrivanje kancera pankreasa, primenom čak i visoko tačnih serumskih tumorskih markera, će dati suviše mnogo lažno pozitivnih i ne preporučuje se. Kao primer za ovo su podaci iz studije u kojoj je na 70 940 asimptomatskih osoba izvršen *screening* primenom CA 19-9: četiri slučaja kancera pankreasa je otkriveno uporedo sa 1 059 lažno pozitivnih slučajeva, što je dalo pozitivnu prediktivnu vrednost od 0,9% (26).

Kada se vrši *screening* visoko rizične populacije, mnoge lezije otkrivene *imaging*-om su prekarcinogene mase. U ovakvim slučajevima CA 19-9 u serumu je često normalan u okviru normalnog opsega. Pošto se mnogi pankreasni adenokarcinomi razvijaju iz mikroskopskih displastičnih lezija koje se sada nazivaju »PanIN« (pankreasna intraepitelijalna neoplazija), smatra se da ni *imaging* niti serumski tumorski markeri neće otkriti ove neoplazme dok ne postanu invanzivni kanceri (27). Serumski tumorski markeri možda mogu da budu važni za otkrivanje ranih asimptomatskih invanzivnih pankreasnih kancera, ali mora da se sačeka sa prospektivnim studijama, pošto trenutno postoji samo mali broj informacija o ulozi tumorskih markera u ovom pogledu. Preporuke AGA objavljene 1999. godine ne preporučuju *screening* pošto u to vreme nije postojala ni jedna strategija koja je otkrivala rane kancere pankreasa kod pacijenata sa povišenim rizikom za razvoj ovih kancera.

Prognoza. Serumski nivoi CA 19-9 nose nezavisnu prediktivnu vrednost za određivanje resektabilnosti pankreasnog kancera (16, 23), kao i za sveopšte preživljavanje pacijenta (24). Na primer, retrospektivni revijalni pregled 104 pacijenta sa kancerom pankreasa tretiranih sa radioterapijom je pokazao da je nivo CA 19-9 pri dijagnozi značajan prognostički indikator, sa medijanom stope preživljavanja od 8 i 20 meseci za pacijente sa vrednošću CA 19-9 iznad ili ispod medijane (680 kU/L) (28). Medijana vremena preživljavanja je značajno duža kod pacijenata gde se nivoi CA 19-9 vraćaju u normalu posle resekcije pankreasnog kancera, nego kod onih gde CA 19-9 ostaje povišen (24). Preoperativni nivoi CA 19-9 koji se ne mogu detektovati su u korelaciji sa poboljšanim

preživljavanjem pacijenata sa resektabilnim pankreasnim adenokarcinomom (29).

Dok AGA vodiči specifično ne komentarišu ovu temu, EGTM vodiči smatraju da CA 19-9 ima potencijal da proceni prognozu kod pankreasnog kancera, ali je njegova primena u ove svrhe nedokazana (21). NACB grupa preporučuje da serumske nivoe CA 19-9 bi trebalo uzeti u obzir za stratifikaciju rizika pacijenata sa kancerom pankreasa. Mada su visoke vrednosti CA 19-9 nepovoljan prognostički indikator, one su samo jedan od mnogih parametara koji utiču na prognozu i na odluke o primeni terapije.

Kontrola terapije. Dostupan je znatan broj dokaza koji se odnose na ulogu serijskog određivanja CA 19-9 kod praćenja palijativne hemioterapije za kancer pankreasa. Kod pacijenata tretiranih palijativnom gemcitabin hemioterapijom, smanjenje CA 19-9 za više od 20% u poređenju sa bazalnom vrednošću posle 8 nedelja (2 ciklusa) je bolji indikator odgovora na terapiju i preživljavanja nego CT *imaging*. Nijedan pacijent nije imao smanjenje nivoa CA 19-9 u prisustvu progresivne bolesti, a svi pacijenti sa objektivnim odgovorom (delimičnim ili kompletnim) su imali smanjenje CA 19-9 za više od 20% (30). Nezavisna prognostička vrednost serijske kinetike CA 19-9 je takođe pokazana primenom različitih palijativnih kombinacija hemioterapije. U jednoj studiji kod pacijenta sa uznapredovalim pankreasnim kancerom tretiranih sa gemcitabinom i cisplatinom, kod pacijenata koji su postigli potpunu remisiju pokazan je povratak CA 19-9 u normalni opseg, a kod onih koji su postigli delimičnu remisiju pokazano je smanjenje vrednosti CA 19-9 (31).

Serijsko određivanje CA 19-9 ima veću osetljivost i specifičnost za utvrđivanje odgovora na terapiju od individualnog određivanja. Smanjenje vrednosti CA 19-9 ukazuje na malu verovatnoću progresije tumora i da treba nastaviti sa tretmanom, dok pacijenti sa povećanjem CA 19-9 za vreme hemioterapije sa gemcitabinom imaju lošu prognozu i odsustvo značajnog poboljšanja u kliničkom odgovoru, tako da se dalja primena hemioterapije dovodi u pitanje (30).

čajnog poboljšanja u kliničkom odgovoru, tako da se dalja primena hemioterapije dovodi u pitanje (30).

Serijsko određivanje CA 19-9 radi praćenja odgovora na radioterapiju je manje praktično, pošto je radioterapija ograničena maksimalnim tolerantnim dozama i kratko traje u poređenju sa palijativnom hemioterapijom. Kada se serijske vrednosti CA 19-9 koriste za praćenje prognoze pacijenata posle hemioradioterapije, one predviđaju povratak bolesti sa osetljivošću od 100% i specifičnošću od 88% (32).

U trenutnim vodičima AGA Nacionalne kombinovane mreže za kancer (NCCN, *National Comprehensive Cancer Network*) i EGTM je navedeno da se određivanje CA 19-9 još ne preporučuje za praćenje efikasnosti tretmana pankreasnog kancera. NACB grupa preporučuje da se serijsko određivanje CA 19-9 može koristiti zajedno sa *imaging*-om za praćenje odgovora pacijenta na terapiju, posebno palijativnu hemioterapiju. Serijska kontrola CA 19-9 se takođe preporučuje u praćenju pacijenata posle potencijalno izlečive hirurgije, mada korisnost otkrivanja ranog porasta vrednosti CA 19-9 i ustanovljavanje terapije pre drugih dokaza povratka bolesti se mora potvrditi u daljim ispitivanjima.

Genetsko testiranje nasledne osetljivosti. Kod pojedinca sa nasleđenim mutacijama BRCA2, p16 (porodični atipični multipli melanom mladeža), STK11 (*Peutz-Jeghers*-ov sindrom), katjonskog tripsinogena (nasledni pankreatitis), FANCC, FANCG i povremeno pogrešno sparenim repariranim genskim defektima (nasledni ne-polipni kolorektalni kancer), povećan je rizik za razvoj naslednog kancera pankreasa (33). Većina poznatih nasleđenih slučajeva pankreasnog kancera je usled BRCA2 mutacija germalne linije, koje su pronađene kod približno 10% porodičnih pankreasnih kancera i približno 5% pacijenata sa prividno sporadičnim kancerom pankreasa (34). Rođaci sa BRCA2 mutacijama germalne linije mogu imati multiple pankreasne kancere u odsustvu kancera dojke ili ovarijuma. U mnogim centrima u

Tabela II Genetsko testiranje kod naslednog kancera pankreasa.

Gen	Karakteristike i kliničke implikacije	LOE
BRCA2	Mutiran kod ~5% pacijenata sa prividno sporadičnim pankreasnim kancerom i kod 5–17% pacijenata sa familijarnim pankreasnim kancerom.	I
STK11	Mutacije germalne linije pronađene samo kod onih sa fenotipom <i>Peutz Jeghers</i> -ovog sindroma. Pacijenti sa ovom bolešću imaju rizik od ~30% da će se razviti pankreasni kancer.	I
Katjonski tripsinogen	Genetsko testiranje u kontekstu naslednog pankreatitisa.	I
p16	Razmatra se za pacijente sa pankreasnim kancerom koji se javlja kod porodica za koje se sumnja da imaju sindrom familijarnog atipičnog melanoma mladeža (FAMM). Prevalencija p16 mutacija germalne linije nije ustanovljena za porodice sa pankreasnim kancerom i melanomom koji ne ispunjavaju kriterijume za FAMM.	II

LOE (level of evidence)

Americi, pacijentima sa jakom porodičnom istorijom pankreasnog kancera se preporučuje da se genetski testiraju za BRCA2 mutacije germalne linije posle odgovarajućeg genetskog savetovanja. Ovo je zasnovano na mišljenju stručnjaka i primenjuje se na populaciju gde su mutacije BRCA2 dokazane kod pacijentata sa familijarnim pankreasnim kancerom (34, 35). Kao dodatak razmatranjima u pogledu na mastektomiju i ooforektomiju (ovarijektomija), BRCA2 mutacije germalne linije mogu imati korist od *screening*-a za traženje dokaza pankreasne neoplazije, ali je ovo još uvek pod ispitivanjem. Drugi poznati geni prouzrokuju samo veoma mali procenat familijarnih kancera pankreasa. Familije pankreasnog kancera sa malignim melanomom će povremeno prikriti p16 mutacije germalne linije, ali ne postoji dovoljno dokaza da se preporuča ovim pacijentima testiranje p16 gena (36). Pojedinci sa pankreasnim kancerom koji su iz familije, koja ima više članova sa melanomom, mogu imati sindrom familijarnog atipičnog melanoma mladeža (FAMM, *familial atypical melanoma mole*) i u ovakvoj grupi testiranje p16 gena je odgovarajuće (Tabela II).

Tkivni markeri kancera pankreasa. Infiltrirajući adenokarcinomi pankreasa različito ekspimiraju veliki broj proteina i mnogi od ovih proteina se mogu detektovati primenom komercijalno dostupnih antitela (Tabela III). Neki od ovih tkivnih markera mogu da pomognu u dijagnozi kancera pankreasa, ali ona ne bi trebalo da se zasniva na imunohistohemijskom obeležavanju tkiva.

Svi adenokarcinomi pankreasa pokazuju ekspresiju citokeratina (CK) i skoro svi mogu da budu obeleženi sa antikeratinskim antitelima AE1/AE3 i CAM 5.2 (37, 38). Sada su dostupna antitela za brojne citokeratine različite molekulske težine. CK 7, CK 8,

CK 18 i CK 19 pokazuju ekspresiju kod 70–100% pankreasnih kancera (36). CK 17 je ekspimiran kod 50–70%, a CK 20 kod manje od 20% (37). »Patern« imunoobeležavanje citokeratina je dijagnostički korisno, pošto većina acinarnih neoplazmi i većina dobro diferenciranih endokrinih neoplazmi pankreasa ne ekspimiraju CK 7.

Duktalni adenokarcinomi pankreasa takođe pokazuju ekspresiju epitelijskog membranskog antigena (EMA) i različitih tumorskih antigena kao što su CEA, CA 19-9, CA 125 i DU-PAN-2 (37). Ekspresija CEA je posebno korisna u razlikovanju infiltrativnog adenokarcinoma od reaktivnih žlezdi.

Adenokarcinomi pankreasa pokazuju ekspresiju nekoliko mucina kao što su MUC 1 (panepitelijski mucinski ekvivalent EMA), MUC 3, MUC 4 i MUC 5AC (gastrointestinalni foveolarni mucin) (39). Četvrtina duktalnih adenokarcinoma će ekspimirati MUC 6 (mucin pilorične žlezde), ali manje od 10% će ekspimirati MUC 2. Ovaj »patern« mucinske ekspresije može pomoći u razlikovanju duktalnog adenokarcinoma od drugih tipova tumora u pankreasu. Na primer, većina intraduktalnih papilarnih mukoznih neoplazmi (IPMN) i mukoznih cističnih neoplazmi (MCN) pankreasa izražavaju MUC 2, ali ne i MUC 1 (40). Trenutno se ispituje ekspresija MUC 4 u smislu njene korisnosti za dijagnozu pankreasnog kancera i da li može pomoći u razlikovanju uzoraka tkiva pankreasnog kancera od uzoraka sa hroničnim pankreatitisom. Ekspresija MUC 4 postaje sve više i više verovatna u uznapredovalom stadijumu PanIN (41).

Tumorski supresorni gen SMAD4 (DPC4/MADH4) je genetski inaktivan kod 55% pankreasnih kancera i mutacije u DPC4 genu su u visokoj korelaciji sa gubitkom

Tabela III Tkivni markeri kod duktalnog adenokarcinoma pankreasa.

Tkivni markeri	Karakteristike i kliničke implikacije	LOE
CK 7, CK 8, CK 18 i CK 19	Ekspimiran kod 70–100% slučajeva	I
CK 17	Ekspimiran kod 50–70% slučajeva	I
CK 20	Ekspimiran kod < 20% slučajeva	I
CEA	Razlikuje infiltrativni adenokarcinom od reaktivnih žlezda.	II
MUC 2	Ekspimiran kod < 10% pankreasnih adenokarcinoma, ali u većini kod IPMN	II
MUC 6	Ekspimiran kod 25% slučajeva	II
Trefoil faktor-2	Ekspimiran kod manjine pankreasnih adenokarcinoma, ali > 90% kod IPMN i MCN	IV
Mezotelin	Ekspimiran kod približno 100% slučajeva; pilot studije ukazuju da proteinska ekspresija dobijena imunohistohemijskim tehnikama može pomoći u citološkoj interpretaciji	IV
MADH4/SMAD4/DPC4 tumorski supresorni gen	Nishodno regulisan kod 55% slučajeva; udružen je sa lošom prognozom	I

CK (citokeratin), LOE (level of evidence)

proteinske ekspresije. Kanceri koji pokazuju abnormalni gubitak SMAD4 proteinske ekspresije imaju lošiju prognozu. Pošto se gubitak ekspresije SMAD4 samo povremeno pronalazi kod drugih kancera i nije karakteristika ne-neoplastičnih pankreasnih stanja, za ekspresiju SMAD4 je pokazano da olakšava interpretaciju citoloških uzoraka koji se teško dijagnostikuju (42).

Tumorski markeri koji se ispituju za primenu kod kancera pankreasa (kategorija B)

CA 242 je definisan sa monoklonskim antitelom C 242, koje je dobijeno imunizacijom miševa sa ćelijskom linijom kolorektalnog karcinoma, COLO 205. To je nefukozilisani prekurzor sialil-Lewis^c-ovog antigena i serumski je marker mucinskog porekla. Nivoi ovog markera u serumu ne zavise od sekretornog statusa Lewis^a-ovog antigena. Dostupan je znatan broj objavljenih podataka o dijagnostičkoj korisnosti CA 242 kao markera pankreasnog kancera. U zavisnosti od ispitivane populacije, pokazana je osetljivost od 41–75% i specifičnost od 85–95% za dijagnozu pankreasnog kancera. Generalno, objavljenе dijagnostičke performanse su slične onima za CA 19-9 (43, 44). Kod pacijenata sa pankreasnim kancerom, CA 19-9 (*cutoff* vrednost, 37 kU/L) i CA 242 (*cutoff* vrednost, 20 kU/L) suštinski imaju iste karakteristike. Pokazano je da CA 242 ima bolji specifičnost (> 90%), a CA 19-9 bolju osetljivost (> 70%) (45). Nivoi CA 242 takođe imaju prognostički značaj. Pacijenti sa resektivnim pankreasnim kancerom i preoperativnim vrednostima CA 242 manjim od 25 kU/L imaju značajno bolju prognozu od pacijenata sa višim nivoima CA 242, nezavisno od resektabilnosti i vrednosti CA 19-9 (46). Prednosti CA 242 nad CA 19-9 obuhvataju njegovu nezavisnost od statusa Lewis-ovog antigena, kao i to da na njegove nivoe manje utiče holestaza. U zaključku, za CA 242 je poka-

zano da ima slične ali ne i superiornije dijagnostičke performanse u poređenju sa CA 19-9. U izabranim situacijama, kao što je Lewis^a-ov nesekretorni status, njegovo određivanje može biti klinički korisno.

CAM 17.1 je stvoren posle imunizacije sa kolorektalnim kancerskim ćelijama. CAM 17.1 je antitelo IgM tipa sa visokom specifičnošću za intestinalni mukus, naročito u kolonu, malom intestinumu, bilijarnom traktu i pankreasu. Epitop koji se detektuje sa CAM 17.1 antitelom je sialilinisani antigen krvne krupе tip-1, verovatno sialil-I (20). Početna ispitivanja na serumu pacijenata sa kancerom pankreasa i raznim kontrolnim grupama (hronični pankreatitis, zdrave osobe, osobe sa drugim gastrointestinalnim karcinomima) pokazuju osetljivost od 67–78% i specifičnost od 76–91%. Dijagnostička osetljivost CAM 17.1 je slična kao za CA 19-9, ali CAM 17.1 može imati višu specifičnost (47). U jednoj velikoj prospektivnoj studiji je pokazano da serumski CAM 17.1 kod pacijenata za koje se sumnja da imaju pankreasni kancer, ima osetljivost za predviđanje pankreasnog kancera od 86% i specifičnost od 91%, a ukoliko pacijenti nemaju žuticu, osetljivost je 89% i specifičnosti je 94% (48). Kombinacija CAM 17.1 i abdominalne sonografije dalje povećava osetljivost do 94%. Visoki nivoi CAM17.1 (> 200 U/L) takođe predviđaju neresektabilnost. Ekspresija CAM 17.1 je pod uticajem statusa Lewis^a-ovog antigena, tako da je isto ograničenje (7–10% nesekretornih u opštoj populaciji) kao kod primene CA 19-9. Potencijalna superiornost u odnosu na CA 19-9 u smislu specifičnosti nije potvrđena u drugim studijama.

Tkivni polipeptidni specifični antigen (TPS) je epitop iz solubilnih fragmenata citokeratina 18; stvara se za vreme kasne S i G2 faze i oslobađa se odmah posle mitoze. Mali broj podataka postoji o korisnosti određivanja TPS u serumu za dijagnozu

Tabela IV Serumski proteinski markeri kao kandidati za duktalni adenokarcinom pankreasa.

Marker	Faza razvoja	Primene i potencijalne primene	LOE
CA 19-9	Prihvaćena klinička primena	Praćenje težine bolesti, kao pomoć pri dijagnozi	I
CA 242	Evaluacija	Dijagnoza; nije superiorniji od CA 19-9	III
CAM 17.1	Evaluacija	Dijagnoza; nije superiorniji od CA 19-9	III
TPS	Evaluacija	Dijagnoza; nije superiorniji od CA 19-9	III
MIC-1	Istraživanje/otkrivanje	Dijagnoza; možda je osetljiviji nego CA 19-9, ali je takođe često povećan kod pacijenata sa hroničnim pankreatitisom	III
Osteopontin	Istraživanje/otkrivanje	Dijagnoza; neophodna su ispitivanja koja koriste plazmu kao uzorak i tačne testove	IV
TIMP-1	Istraživanje/otkrivanje	Dijagnoza; neophodna su ispitivanja koja koriste plazmu kao uzorak i tačne testove	IV
SELDI proteomik profiliranje	Istraživanje/otkrivanje	Dijagnoza; pilot studije su identifikovale peptidne markere, ali potrebne su i studije za potvrđivanje	IV

LOE (level of evidence)

pankreasnog kancera, a osetljivost (50–98%) i specifičnost (22–73%) značajno variraju. Najviša medijalna serumska vrednost TPS je pronađena kod pacijenata sa malignim bolestima jetre, ali visoke medijalne vrednosti su takođe izmerene i kod pacijenata sa pankreasnim kancerom, kancerom žučnog kanala i kod benignih bolesti jetre. Pokazano je (na ograničenom broju pacijenata) da TPS ima bolje karakteristike u praćenju palijativne hemioterapije kod uznapredovalog kancera pankreasa u poređenju sa CA 19-9 (49). Sposobnost TPS da razlikuje pacijente sa hroničnim hepatitisom od onih sa kancerom pankreasa je ispitivana ali se nije došlo do određenog zaključka. Kod pacijenta sa sumnjom da imaju kancer pankreasa ili hronični pankreatitis, povišeni nivoi TPS (> 100 U/L) su pronađeni kod svih pacijenata sa pankreasnim kancerom, dok povećane vrednosti CA 19-9 (> 37 kU/L) su pronađene kod 70% pacijenata. Povećane vrednosti TPS su pronađene kod 22%, a CA 19-9 kod 19% pacijenata sa hroničnim pankreatitisom. Ako se koristi *cutoff* vrednost od 200 U/L, TPS ima osetljivost 97% i specifičnost 98% u razlikovanju kancera pankreasa od hroničnog pankreatitisa (50). Ovi podaci ukazuju da TPS može imati ulogu u otkrivanju ranog kancera pankreasa i u praćenju odgovora na terapiju, ali su potrebna dalja ispitivanja pre utvrđivanja definitivnih preporuka.

Potencijalni tumorski markeri za kancer pankreasa koji su još u stadijumu ispitivanja ili otkrivanja (kategorija C)

Serumski makrofagni inhibitorni citokin 1 (MIC-1) je prvobitno otkriven u prekomernoj ekspresiji u pankreasnom i kolorektalnom kanceru u studijama o genskoj ekspresiji i takođe je prekomerno eksprimiran kod kancera prostate i drugih kancera (51). Nivo MIC-1 u serumu i njegov genotip su udruženi sa progresijom i prognozom kolorektalnog karcinoma. Dijagnostički učinak MIC-1 je ispitivan njegovim određivanjem (ELISA) u serumu pacijenata sa resektabilnim pankreasnim kancerom, resektabilnim ampularnim i holangiokarcinomom, drugim pankreasnim neoplazmama, hroničnim pankreatitisom, kao i kod zdrave kontrolne grupe. MIC-1 u serumu je imao osetljivost 71% i specifičnost 78% (*cutoff* – 1070 ng/L). CA 19-9 je imao sličnu dijagnostičku korisnost u ovoj studiji (ROC AUC 0,81 za MIC-1, a 0,77 za CA 19-9). Kombinacija MIC-1 i CA 19-9 značajno je poboljšala dijagnostičku tačnost (ROC 0,87) u poređenju sa pojedinačnim markerima. MIC-1 u serumu bio je povišen kod 96% pojedinaca sa resektabilnim pankreasnim kancerom, kao i kod 42% pojedinaca sa hroničnim pankreatitisom. Dijagnostička tačnost MIC-1 dobijena primenom ROC analize bila je značajno bolja nego za CA 19-9 (52).

Osteopontin (OPN) je prvo otkriven kao protein udružen sa transformacijom i smatralo se da je

od značaja u procesima nastanka tumora i metastaza. OPN je prekomerno eksprimiran u kancerima pluća, dojke, prostate, želuca, egzofagusa i ovarijuma (53). Tehnologija profiliranja genske ekspresije je takođe bila korišćena za demonstraciju povećanja mRNK ekspresije OPN kod pankreasnih kancera (54). Kao sekretovana molekula, serumski OPN može da se meri primenom ELISA metode dizajnirane da ograniči interakcije osteopontin faktora H u serumu. Za određivanje OPN u serumu kod pacijenata sa resektabilnim pankreasnim kancerom je pokazano da nadvladava učinak CA 19-9, sa specifičnošću od 97% i osetljivošću od 80% (*cutoff* – 334 μ g/L).

Tkivni inhibitor metaloproteinaze tip 1 (TIMP-1) je prvi put identifikovan kao potencijalni marker pankreasnog kancera posle otkrića da je prekomerno eksprimiran u tkivu pankreasnog kancera. Nivoi TIMP-1 u plazmi su povećani kod pacijenata sa kolorektalnim kancerima i imaju prognostički značaj kod kolorektalnog karcinoma (55), kao i kod primarnog kancera dojke (56). Evaluacija određivanja TIMP-1 primenom komercijalnih ELISA testova kojima se određuju slobodne i kompleksovane forme je pokazala značajno više nivoe u serumu pacijenata sa pankreasnim kancerom u poređenju sa normalnom kontrolnom grupom. Dok TIMP-1 u serumu ne prevazilazi učinak CA 19-9, kombinovanim određivanjem TIMP-1, CEA i CA 19-9 postiže se specifičnost od 100% pri osetljivosti od 60% (optimizira *cutoff* vrednost prema specifičnosti) i specifičnost od 95% pri osetljivosti od 81% (optimizira *cutoff* vrednost prema osetljivosti), što ukazuje na potencijalnu korisnost kombinovanih markera (57). Dalje ispitivanje dijagnostičke korisnosti određivanja TIMP-1 za dijagnozu pankreasnog kancera je neophodno zajedno sa evaluacijom testova i najpodesnije telesne tečnosti za analizu (plazma ili serum).

Serumski proteomik markeri. Pošto serumski proteom sadrži mnoge potencijalne biomarkere za detekciju bolesti, nekoliko proteomik pristupa je korišćeno za identifikaciju novih proteinskih markera bolesti. Jedna od najčešće korišćenih analitičkih platformi za visoku prolaznost proteomik studija primenjuje *ProteinChip® Biomarker System-II*, takođe poznat kao površinski-poboljšana laserska desorpcija/ionizacija (SELDI, *surface-enhanced laser desorption/ionization*), i niske rezolucije TOF (*time-of-flight*) maseni spektrometar. Pilot studije koje koriste SELDI su identifikovale kandidate – biomarkere kod kancera ovarijuma, dojke, prostate i pankreasa (58–60). Koopmann i sar. su uporedili uzorke seruma pacijenata sa resektabilnim pankreasnim adenokarcinomom primenom SELDI sa uzorcima zdravih osoba i pacijenata sa raznim bolestima (58). Pronašli su dva odvojena peptidna pika koji mogu razlikovati pacijente sa pankreasnim kancerom od zdrave kontrolne grupe sa osetljivošću od 78% i specifičnošću od 97%, što prevazilazi učinak CA 19-9. Dijagnostička tačnost ova dva peptida je poboljšana njihovom primenom u

kombinaciji sa CA 19-9. SELDI markeri su takođe bolji od CA 19-9 u razlikovanju pacijenata sa pankreasnim kancerom od onih sa pankreatitisom. Mada ovi rezultati ukazuju na potencijalnu dijagnostičku korist određivanja malih serumskih peptidnih markera pankreasnog kancera, velike multicentrične studije su potrebne za potvrdu ovih nalaza i za preciznu identifikaciju peptidnih markera tako da se mogu dizajnirati specifičnija određivanja za njihovu detekciju.

Markeri pankreasnih neoplazmi koji se mogu detektovati u pankreasnom soku

Serumski markeri igraju važnu ulogu u dijagnozi mnogih kancera, ali su manje korisni za identifikaciju ne-invazivnih neoplazmi. Potreba za identifikacijom veoma malih neinvazivnih pankreasnih neoplazmi vodi do interesa za identifikaciju novih markera pankreasnih neoplazmi koji se mogu primeniti na uzorak pankreasnog soka (Tabela V). Tačan molekularni marker pankreasne neoplazije koji se može primeniti za testiranje nerešivih citoloških uzoraka ili uzoraka biopsije bi bio dragocen za evaluaciju pacijenata sa suspektnim kancerom pankreasa. Uzorci pankreasnih sekrecija (pankreasni sok) su takođe atraktivni dijagnostički uzorci zato što imaju visoke koncentracije neoplastične DNK i proteina i mogu biti korisni klinički uzorci za primenu kada se dijagnostikuju simptomatski pacijenti, kao i kada se vrši *screening* visokorizičnih pojedinaca za dokazivanje ranog pankreasnog kancera ili prekancerogenih neoplazmi pankreasa, što je pristup analogan primeni aspirata bradavice za dijagnozu kancera dojke.

Višestruke studije su utvrdile korisnost primene uzoraka pankreasnog soka za otkrivanja DNK metilacionih promena, DNK mutacija i proteinske prekomerne ekspresije. Na primer, mutirani K-ras gen se brzo detektuje u pankreasnom soku, ali u plazmi ove mutacije se obično mogu detektovati samo kod paci-

jenata koji imaju inoperabilni kancer (61). Sakupljanje čistog pankreasnog soka zahteva ERCP, ali pankreasni sok može takođe biti sakupljen u duodenumu i analiziran na prisustvo kancerske DNK za vreme rutinske endoskopije gornjeg gastrointestinalnog trakta, posle stimulacije sekretinom bez potrebe za ERCP. Marker pankreasnog soka i testovi dizajnirani za njihovu detekciju su trenutno još uvek pod evaluacijom i nije još pokazano da su korisni u kliničkoj praksi.

Promene DNK u pankreasnom soku kao markeri kancera pankreasa

Mutirana DNK. Dijagnostički potencijal markera zasnovanih na DNK je poboljšan poslednjih godina, sa napretkom tehnologije kao što su tehnologija zasnovana na čipovima i kvantitativna PCR (*polymerase chain reaction*). DNK mutacije se mogu otkriti u vrlo niskim koncentracijama, čak kada je mutantni alel pomešan sa stotinama ili čak hiljadama divljih tipova alela. Bez obzira na tačnost detekcionih metoda zasnovanih na DNK i višestrukih gena koji su meta za mutacije kod kancera pankreasa, identifikovano je nekoliko somatskih mutacija sa idealnim dijagnostičkim karakteristikama. Idealni genetski marker bi trebalo da bude prisutan u praktično svim pankreasnim kancerima i da se lako detektuje. Najlakše mutacije za otkrivanje su one koje su ograničene samo na jedan kodon ili na veoma specifičnu porciju ciljnog gena kao što je K-ras ili BRAF (61, 62). Nažalost, K-ras mutacije nisu specifične za invazivni pankreasni kancer; ispitivanja ovih mutacija u pankreasnim tkivima, pankreasnom soku i stolici su pokazala da se one dešavaju kod pacijenata sa hroničnim pankreatitisom, sa PanIN (bez prisutnog kancera pankreasa) i kod pušača (63).

Mutacije TP53 gena generalno se dešavaju relativno kasno kod neoplastičnog do invazivnog

Tabela V DNK markeri kao kandidati primenjivi za analizu pankreasnog soka.

Marker	Faza razvoja	Potencijalne primene	LOE
Mutant p53	Evaluacija	Dijagnoza: za mutacije se smatra da su visoko specifične za neoplazije, ali bolja određivanja su potrebna za otkrivanje spektra mutacija p53 i za njihovo određivanje pri niskim koncentracijama. Takođe je potrebno da se koriste metode pogodne za rutinsku primenu u kliničkim laboratorijama.	I
Mutant KRAS	Evaluacija	Dijagnoza: KRAS mutacije nisu specifične za pankreasni kancer. Trenutno su u toku dalja istraživanja za evaluaciji dijagnostičke tačnosti određivanja ovog markera.	I
Metilisana DNK	Evaluacija	Dijagnoza: brojni kandidati kao što su SPARC, TFPI-2, ppENK i dr. Svaki od njih je umereno osetljiv i visoko specifičan za pankreasni kancer; određuju se MSP tehnikom. Trenutna ispitivanja procenjuju njihovu dijagnostičku tačnost.	IV
Mitohondrijalne mutacije DNK	Evaluacija	Dijagnoza: pilot studije koje koriste čip tehnologiju	IV

LOE (level of evidence)

pankreasnog kancera, a otkrivanje mutacija TP53 gena se široko ispituju kao potencijalni specifični dijagnostički marker kod raznih kancera. Kod pankreasnog dukalnog adenokarcinoma, mutacije TP53 gena su pronađene kod približno 70% slučajeva invazivnih kancera (64). Mada je poznato da postoji nekoliko nukleotidnih ključnih tačaka za mutacije TP53 gena, mutacije se dešavaju na celom genu. Ključna mesta mutacije TP53 gena nastaju zbog specifičnih faktora okruženja, pušenje ili izlaganje aflatoksinu, tako da prevalencija mesta mutacija TP53 gena varira sa ispitivanom populacijom. Većina studija na mutacijama TP53 gena kao markera kancera koristi metode kao što su čip tehnologija, jednolančani konformacioni polimorfizam i kapilarna elektroforeza sa temperaturnim gradijentom, koje imaju potencijal da identifikuju kompletan spektar mutacija TP53 gena. Osetljivost i granica detekcije ovih tehnologija nije tako dobra kao strategija koja detektuje mutacije pojedinačnih nukleotida. Metode kao što su jednolančani konformacioni polimorfizam (SSCP, *single-strand conformational polymorphism*) i kapilarna elektroforeza sa temperaturnim gradijentom, mogu detektovati mutacije koje su prisutne u najmanje 1% i češće 5–10% ukupne DNK (65). Primenom SSCP, istraživači su objavili prisustvo mutacija TP53 gena, sa eksonima 5–8, u uzorcima pankreasnog soka i u četkastim citološkim uzorcima od 40–50% pacijenata sa kancerom pankreasa. Ova cifra je bliska broju mutacija što bi neko očekivao da pronađe u primarnim kancerima pankreasa kod ovih pacijenata (66). Genetska čip tehnologija ima prednost što može da identifikuje, u samo jednom određivanju, veliki procenat mogućih mutacija TP53 gena u datom DNK uzorku, ako je mutacija prisutna u uzorku u dovoljnoj koncentraciji (> 1% od normalne DNK). Mada su ovi genski čipovi veoma efikasni u identifikaciji besmislenih mutacija, oni mogu propustiti otkrivanje malih delecija i ubacivanja (insercija) koje predstavljaju približno 10–20% svih mutacija TP53 gena. U studijama koje koriste Affymetrix™ TP53 genski čip, istraživači su bili u mogućnosti da identifikuju približno 80% svih mutacija TP53 gena u tkivima nemikrocelularnog kancera pluća (67). Koncentracija mutirane DNK u pankreasnom soku pacijenata sa pankreasnim kancerom može biti manja od 1% totalne DNK tako da korisnost primene čip-određivanja TP53 gena za dijagnozu pankreasnog kancera ostaje da se ustanovi.

Sve veća primena čip tehnologije je takođe olakšala istraživanja dijagnostičke korisnosti mitohondrijalnih mutacija. Mitohondrijalne mutacije su obično prisutne kod multiplih tipova kancera. Prednost mitohondrijalne DNK kao tumorskog markera je da svaka ćelija ima više kopija mitohondrijalnog genoma nego nuklearna DNK, a količina mitohondrijalne DNK je nekoliko puta veća u kancerskim ćelijama nego što je u normalnom tkivu (68). Da bi se efikasno ispitao mitohondrijalni genom, razvijena je »MitoČip« tehnolo-

logija, i početne studije ukazuju da se ovaj čip može koristiti za otkrivanje mitohondrijalnih mutacija u uzorcima pankreasnog soka dobijenih od pacijenata sa kancerom pankreasa, kao i u urinu pacijenata sa kancerima urinarnog trakta (69). Ovi rezultati su preliminarni i zahtevaju potvrdu u većim prospektivnim studijama.

Metilisana DNK. Pošto je nenormalna hipermetilacija tumorskih supresornih gena uobičajena za karcinogenezu, abnormalne metilacije DNK mogu biti posebno pogodne za primenu u ranim detekcionim strategijama. Nekoliko desetina gena, kao što su SPARC, ppENK, p16, TSLC1 i TFPI-2, su identifikovani kao nenormalno metilisani kod pankreasnih kancera: neki od ovih markera su nenormalno metilisani kod približno 90% pankreasnih kancera (70). Otkrivanje ovakvih nenormalnih metilacionih promena u kliničkim uzorcima je moguće sa PCR specifičnom za metilaciju (MSP) (71). MSP zahteva bisulfitne modifikacije DNK da bi se pretvorili svi nemetilisani citozini u uracile. MSP se koristi uspešno za identifikaciju metilisane DNK u većini bioloških tečnosti, uključujući krv, FNA aspirate, salivu i sputum od pacijenata sa kancerom. Kvantifikacija metilisane DNK primenom *real-time* MSP se upotrebljava u pokušaju za tačnije razlikovanje kancera od neneoplastičnih bolesti. Početne studije kod pacijenata sa pankreasnom bolešću su pokazale da nenormalni DNK metilacioni »paterni« se mogu identifikovati u uzorcima pankreasnog soka od pacijenata sa kancerom pankreasa i da se oni samo retko mogu naći u uzorcima pankreasnog soka od pacijenata bez prisutnog kancera pankreasa (70, 72). Mada su ovi podaci obećavajući, moraju se uzeti u obzir neke biološke osobine DNK metilacije kada se metilisani DNK markeri razmatraju za upotrebu u kliničkoj praksi kao tumorski markeri. Ovo uključuje tkivno specifične razlike u normalnom metilacionom »paternu«, povećanje u metilaciji DNK sa godinama starosti pacijenta, ograničenja bisulfitne modifikacije i potencijal metilisanih DNK markera da otkrivaju rane neoplazme sa malo sklonosti za kancerom (73). Na primer, neki geni koji su normalno nemetilisani u pankreasu i obično metilisani u pankreasnim kancerima podležu metilaciji niskog nivoa u neneoplastičnim duodenalnim tkivima. Neke metilacije u normalnom tkivu kao što je duodenum će verovatnije biti prisutne kod starijih pacijenata. Ovo ukazuje da određivanje DNK metilacije u čistom pankreasnom soku sakupljenog direktno iz pankreasnog kanala ima prednost ako se izbegne moguća duodenalna kontaminacija. Zato što MSP zahteva bisulfitni modifikacioni korak koji prouzrokuje degradaciju DNK, MSP nije tako osetljiv kao običan PCR, i ima nižu granicu detekcije od približno 10–20 kopija (72). Čak pri ovom nivou detekcije, MSP može detektovati metilaciju niskog nivoa koja proističe bilo zbog normalnog starenja ili iz lezija sa niskim malignim potencijalom. Na primer, PanIN niskog stepena se razvija sa povećanom učestalošću kod pankreasa sa

povećanjem starosti, a neki od ovih PanIN prikrivaju metilacione promene koje se ne nalaze u normalnom pankreasnom epitelijumu. Iz tog razloga, geni koji samo pretrpe metilaciju u PanIN visokog stepena i invazivnim kancerima će verovatno imati veću dijagnostičku tačnost za otkrivanje pankreasnog kancera u suprotnosti sa onim koji su metilisani u ranom PanIN.

Tkivni markeri pod istraživanjem

Mnogi proteini koji su različito ekspimirani kod kancera pankreasa su otkriveni putem opštih analiza genske ekspresije. Na primer, mezotelin (izražen je u skoro 100% pankreasnih kancera) je koristan tumorski antigen (74). Sledeći drugi prekomerno ekspimirani proteini su: antigen stem ćelija prostate (ekspimiran u 60% slučajeva), homolog fascina morskog ježa (95%), kladin-4, 14-3-3-sigma, transglutaminaza 2, CDC25B, ADAM9, cdc2/p34, protein 47 toplotnog udara, trefoil faktor-2 i topoizomeraza II alfa (95%) (75, 76). Dva kalikreina, KLK 6 i KLK 10 su značajno ushodno regulisana kod pankreasnog kancera (77), kao što je i veliki broj članova familije S100 proteina (78) i aurora kinaze (79). Klinička korisnost ovih markera u smislu detekcije još nije pokazana. *Microarray* analiza genske ekspresije se proučava kao prognostičko sredstvo za nekoliko kancera, ali zbog vrlo loše prognoze kancera pankreasa, prognostička ispitivanja markera pankreasnog kancera nisu znatno sprovedena. Neki markeri, kao što su kladin-4, S100 A4 i mezotelin, mogu biti korisni za predviđanje, ako IPMN imaju udružen infiltrativni pankreasni karcinom (80). Ovakvi markeri se mogu pokazati da su korisni: za određivanje kod sumnji na IPMN pre operacije, kao pomoć u predviđanju da li je IPMN udružen sa invazivnim kancerom i kao pomoć u odluci za hiruršku operaciju.

Smatra se da će budućnost dijagnoze pankreasnog kancera uključiti molekularno profiliranje za identifikaciju ciljeva za nove terapije. Primer ovome je genetska inaktivacija puta *Fanconi*-jeve anemije u malom procentu pankreasnih adenokarcinoma. Ćelije sa inaktivacijom *Fanconi*-jevog puta su hiperoseptljive na hemioterapeutike, kao što je mitomicin, što može objasniti povremeni odgovor na tretman sa mitomicinom (81). Ovi ohrabljajući podaci ističu potrebu za otkrivanjem koji pankreasni kanceri prikrivaju inaktivaciju puta *Fanconi*-jeve anemije. Očekuje se da ukoliko se identifikuju dodatni terapeutici koji će ciljano delovati na specifične puteve, tačni tumorski markeri će biti potrebni za procenu statusa ovih puteva i za utvrđivanje da li je određeni terapeutik odgovarajući za pojedini pankreasni kancer.

Zaključak

Mada je CA 19-9 najčešće korišćen tumorski marker kancera pankreasa, trenutno se ispituju mnogi drugi potencijalni tumorski markeri. Dodatni markeri su potrebni ne samo da olakšaju ranu dijagnozu pankreasnog kancera, već takođe i da pomognu u dijagnozi prekurzornih lezija pankreasnog kancera. Poznavanje pankreasnih neoplazija se povećava godinama, a sa njim i dokazi iz kliničkih ispitivanja *screening*-a pojedina sa visokim rizikom za razvoj pankreasnog kancera. Ove studije daju podršku ideji da najbolji način za smanjenje mortaliteta od pankreasnog kancera je primena molekularnih markera i pankreasnih *imaging*-a za otkrivanje pacijenata sa prekancerogenim lezijama koje će se verovatno razviti u kancer pankreasa i tretiranje ovih pacijenata dok oni još uvek imaju najbolju šansu da budu izlečeni.

Zahvalnost. Rad je finansiran na osnovu Ugovora br. 145010B sa MNTR Srbije.

Literatura

- DiMagno EP, Reber HA, Tempero MA. AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology* 1999; 117 (6): 1464–84.
- Rosty C, Goggins M. Early detection of pancreatic carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002; 16 (1): 37–52.
- Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004; 350 (12): 1200–10.
- Kroep JR, Pinedo HM, Van Groeningen CJ, Peters GJ. Experimental drugs and drug combinations in pancreatic cancer. *Ann Oncol* 1999; 10 (Suppl 4): 234–8.
- Russell RC. Palliation of pain and jaundice: an overview. *Ann Oncol* 1999; 10: Suppl 4: 165–9.
- Barber MD, Ross JA, Voss AC, Tisdale MJ, Fearon KC. The effect of an oral nutritional supplement enriched with fish oil on weight-loss in patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1999; 81 (1): 80–6.
- Canto MI, Goggins M, Yeo CJ, Griffin C, Axilbund JE, Brune K, et al. Screening for pancreatic neoplasia in high risk individuals. *Clin Gastro Hepatol* 2004; 2: 606–21.
- Ulrich CD. Pancreatic cancer in hereditary pancreatitis: consensus guidelines for prevention, screening and treatment. *Pancreatol* 2001; 1 (5): 416–22.
- Hayes DF, Bast R, Desch CE, Fritsche H, Kemeny NE, Jessup JM, et al. A tumor marker utility grading system

- (TMUGS): a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1456–66.
10. Brand RE, Ding XZ, Young CM, Adrian TE. The specificity of amylin for the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Int J Gastrointest Cancer* 2002; 31 (1–3): 123–8.
 11. Kawa S, Kato M, Oguchi H, Hsue GL, Kobayashi T, Koiwai T, et al. Clinical evaluation of pancreatic cancer-associated mucin expressing CA19-9, CA50, Span-1, sialyl SSEA-1, and Dupan-2. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27 (8): 635–43.
 12. Masson P, Palsson B, Andren-Sandberg A. Evaluation of CEA, CA 19-9, CA-50, CA-195, and TATI with special reference to pancreatic disorders. *Int J Pancreatol* 1991; 8 (4): 333–44.
 13. Shahangian S, Fritsche HA, Hughes JI, Gelder FB. Pancreatic oncofetal antigen and carbohydrate antigen 19-9 in sera of patients with cancer of the pancreas. *Clin Chem* 1989; 35 (3): 405–8.
 14. Hardt PD, Ngoumou BK, Rupp J, Schnell-Kretschmer H, Kloer HU. Tumor M2-pyruvate kinase: a promising tumor marker in the diagnosis of gastro-intestinal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20 (6D): 4965–8.
 15. Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, et al. Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein 1 as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* 2002; 62 (6): 1868–75.
 16. Schlieman MG, Ho HS, Bold RJ. Utility of tumor markers in determining resectability of pancreatic cancer. *Arch Surg* 2003; 138 (9): 951–5.
 17. Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alftan H, Haglund C. CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 2002; 22 (4): 2311–6.
 18. Kawa S, Oguchi H, Kobayashi T, Tokoo M, Furuta S, Kanai M, et al. Elevated serum levels of Dupan-2 in pancreatic cancer patients negative for Lewis blood group phenotype. *Br J Cancer* 1991; 64 (5): 899–902.
 19. Frena A. SPan-1 and exocrine pancreatic carcinoma. The clinical role of a new tumor marker. *Int J Biol Markers* 2001; 16 (3): 189–97.
 20. Eskelinen M, Haglund U. Serological tumor markers in pancreatic cancer. In: Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK, editors. *Tumor markers: physiology, pathobiology, technology and clinical applications*. Washington: AACCC Press, 2002: 265–8.
 21. Tumor markers in gastrointestinal cancers: EGTM recommendations. European Group on Tumor Markers. *Anticancer Res* 1999; 19 (4A): 2811–5.
 22. Duffy MJ. CA 19-9 as a marker for gastrointestinal cancers: a review. *Ann Clin Biochem* 1998; 35 (3): 364–70.
 23. Forsmark CE, Lambiase L, Vogel SB. Diagnosis of pancreatic cancer and prediction of unresectability using the tumor-associated antigen CA19-9. *Pancreas* 1994; 9 (6): 731–4.
 24. Safi F, Schlosser W, Falkenreck S, Beger HG. CA 19-9 serum course and prognosis of pancreatic cancer. *Int J Pancreatol* 1996; 20 (3): 155–61.
 25. Albert MB, Steinberg WM, Henry JP. Elevated serum levels of tumor marker CA19-9 in acute cholangitis. *Dig Dis Sci* 1988; 33 (10): 1223–5.
 26. Kim JE, Lee KT, Lee JK, Paik SW, Rhee JC, Choi KW. Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19 (2): 182–6.
 27. Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, et al. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2004; 28 (8): 977–87.
 28. Katz A, Hanlon A, Lanciano R, Hoffman J, Coia L. Prognostic value of CA 19-9 levels in patients with carcinoma of the pancreas treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41 (2): 393–6.
 29. Berger AC, Meszoely IM, Ross EA, Watson JC, Hoffman JP. Undetectable preoperative levels of serum CA 19-9 correlate with improved survival for patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2004; 11 (7): 644–9.
 30. Ziske C, Schlie C, Gorschluter M, Glasmacher A, Mey U, Strehl J, et al. Prognostic value of CA 19-9 levels in patients with inoperable adenocarcinoma of the pancreas treated with gemcitabine. *Br J Cancer* 2003; 89 (8): 1413–7.
 31. Heinemann V, Schermuly MM, Stieber P, Schulz L, Jungst D, Wilkowski R, et al. CA19-9: a predictor of response in pancreatic cancer treated with gemcitabine and cisplatin. *Anticancer Res* 1999; 19 (4A): 2433–5.
 32. Micke O, Bruns F, Kurowski R, Horst E, deVries AF, Hausler JW, et al. Predictive value of carbohydrate antigen 19-9 in pancreatic cancer treated with radiochemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57 (1): 90–7.
 33. Klein AP, Beaty TH, Bailey-Wilson JE, Brune KA, Hruban RH, Petersen GM. Evidence for a major gene influencing risk of pancreatic cancer. *Genet Epidemiol* 2002; 23 (2): 133–49.
 34. Goggins M, Schutte M, Lu J, Moskaluk CA, Weinstein CL, Petersen GM, et al. Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56: 5360–4.
 35. Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I, Sina-Frey M, Rieder H, Korte B, et al. BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95 (3): 214–21.
 36. Rutter JL, Bromley CM, Goldstein AM, Elder DE, Holly EA, Guerry Dt, et al. Heterogeneity of risk for melanoma and pancreatic and digestive malignancies: a melanoma case-control study. *Cancer* 2004; 101 (12): 2809–16.
 37. Solcia E, Capella C, Klöppel G. *Atlas of tumor pathology: Tumors of the pancreas*. 3rd series ed. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1997.

38. Iacobuzio-Donahue C, Hruban, RH. Gene expression in neoplasms of the pancreas: applications to diagnostic pathology. *Adv Anat Pathol* 2003; 10: 125–134.
39. Terada T, Ohta T, Sasaki M, Nakanuma Y, Kim YS. Expression of MUC apomucins in normal pancreas and pancreatic tumours. *J Pathol* 1996; 180: 160–5.
40. Lüttges J, Feyerabend B, Buchelt T, Pacena M, Klöppel G. The mucin profile of noninvasive and invasive mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 466–71.
41. Swartz MJ, Batra SK, Varshney GC, Hollingsworth MA, Yeo CJ, Cameron JL, et al. MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2002; 117 (5): 791–6.
42. Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, Sohn T, Wilentz RE, Offerhaus GJ, et al. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7 (12): 4115–21.
43. Haglund C, Lundin J, Kuusela P, Roberts PJ. CA 242, a new tumour marker for pancreatic cancer: a comparison with CA 19-9, CA 50 and CEA. *Br J Cancer* 1994; 70 (3): 487–92.
44. Plebani M, Basso D, Navaglia F, D'Angeli F, Panozzo MP, Del Giudice G, et al. Is CA242 really a new tumour marker for pancreatic adenocarcinoma? *Oncology* 1995; 52(1): 19–23.
45. Banfi G, Bravi S, Ardemagni A, Zerbi A. CA 19.9, CA 242 and CEA in the diagnosis and follow-up of pancreatic cancer. *Int J Biol Markers* 1996; 11(2): 77–81.
46. Lundin J, Roberts PJ, Kuusela P, Haglund C. Prognostic significance of serum CA 242 in pancreatic cancer. A comparison with CA 19-9. *Anticancer Res* 1995; 15 (5B): 2181–6.
47. Gansauge F, Gansauge S, Parker N, Beger MI, Poch B, Link KH, et al. CAM 17.1 – a new diagnostic marker in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1996; 74 (12): 1997–2002.
48. Yiannakou JY, Newland P, Calder F, Kingsnorth AN, Rhodes JM. Prospective study of CAM 17.1/WGA mucin assay for serological diagnosis of pancreatic cancer. *Lancet* 1997; 349: 389–92.
49. Glimelius B, Hoffman K, Einarsson R, Pahlman L, Graf W. Monitoring palliative chemotherapy in advanced gastrointestinal cancer using serial tissue polypeptide specific antigen (TPS) measurements. *Acta Oncol* 1996; 35 (2): 141–8.
50. Slesak B, Harlozinska-Szmyrka A, Knast W, Sedlaczek P, van Dalen A, Einarsson R. Tissue polypeptide specific antigen (TPS), a marker for differentiation between pancreatic carcinoma and chronic pancreatitis. A comparative study with CA 19-9. *Cancer* 2000; 89 (1): 83–8.
51. Koopmann J, Buckhaults P, Brown DA, Zahurak ML, Sato N, Fukushima N, et al. Serum macrophage inhibitory cytokine 1 as a marker of pancreatic and other periampullary cancers. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (7): 2386–92.
52. Koopmann J, White N, Rosenzweig J, Zhang Z, Canto MI, Brown DA, et al. Serum markers in patients with resectable pancreatic, adenocarcinoma: macrophage inhibitory cytokine 1 versus CA19-9. *Clin Cancer Res* 2006; 12 (2): 442–6.
53. Furger KA, Menon RK, Tuckl AB, Bramwell VH, Chambers AF. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. *Curr Mol Med* 2001; 1 (5): 621–32.
54. Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Shen-Ong GL, Van Heek T, Ashfaq R, Meyer R, et al. Discovery of novel tumor markers of pancreatic cancer using global gene expression technology. *Am J Pathol* 2002; 160 (4): 1239–49.
55. Yukawa N, Yoshikawa T, Akaike M, Sugimasa Y, Take-miya S, Yanoma S, et al. Prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients with colorectal cancer. *Anticancer Res* 2004; 24 (3b): 2101–5.
56. Schrohl AS, Holten-Andersen MN, Peters HA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, et al. Tumor tissue levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as a prognostic marker in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (7): 2289–98.
57. Zhou W, Sokoll LJ, Bruzek DJ, Zhang L, Velculescu VE, Goldin SB, et al. Identifying markers for pancreatic cancer by gene expression analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 1998; 7 (2): 109–12.
58. Koopmann J, Zhang Z, White N, Rosenzweig J, Fedarko N, Jagannath S, et al. Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 860–8.
59. Koopmann J, Fedarko NS, Jain A, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Rahman A, et al. Evaluation of osteopontin as biomarker for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 487–91.
60. Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, et al. Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* 2002; 62: 1868–75.
61. Castells A, Puig P, Mora J, Boadas J, Boix L, Urgell E, et al. K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol* 1999; 17 (2): 578–84.
62. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949–54.
63. Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE. p16 and K-ras mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 2140–3.
64. Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa L, Yeo CJ, et al. p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* 1994; 54: 3025–33.
65. Yamaguchi Y, Watanabe H, Yrdiran S, Ohtsubo K, Motoo Y, Okai T, et al. Detection of mutations of p53

- tumor suppressor gene in pancreatic juice and its application to diagnosis of patients with pancreatic cancer: comparison with K-ras mutation. *Clin Cancer Res* 1999; 5 (5): 1147–53.
66. Sturm PD, Hruban RH, Ramsoekh TB, Noorduyn LA, Tytgat GN, Gouma DJ, et al. The potential diagnostic use of K-ras codon 12 and p53 alterations in brush cytology from the pancreatic head region. *J Pathol* 1998; 186 (3): 247–53.
67. Ahrendt SA, Hu Y, Buta M, McDermott MP, Benoit N, Yang SC, et al. p53 mutations and survival in stage I non-small-cell lung cancer: results of a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95 (13): 961–70.
68. Jones JB, Song JJ, Hempen PM, Parmigiani G, Hruban RH, Kern SE. Detection of mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer offers a »mass«-ive advantage over detection of nuclear DNA mutations. *Cancer Res* 2001; 61 (4): 1299–304.
69. Maitra A, Cohen Y, Gillespie SE, Mambo E, Fukushima N, Hoque MO, et al. The Human MitoChip: a high-throughput sequencing microarray for mitochondrial mutation detection. *Genome Res* 2004; 14 (5): 812–9.
70. Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL, et al. Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res* 2003; 63 (13): 3735–42.
71. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93 (18): 9821–6.
72. Fukushima N, Walter KM, Uek T, Sato N, Matsubayashi H, Cameron JL, et al. Diagnosing pancreatic cancer using methylation specific PCR analysis of pancreatic juice. *Cancer Biol Ther* 2003; 2 (1): 78–83.
73. Matsubayashi H, Sato N, Fukushima N, Yeo CJ, Walter KM, Brune K, et al. Methylation of cyclin D2 is observed frequently in pancreatic cancer but is also an age-related phenomenon in gastrointestinal tissues. *Clin Cancer Res* 2003; 9 (4): 1446–52.
74. Thomas AM, Santarsiero LM, Lutz ER, Armstrong TD, Chen YC, Huang LQ, et al. Mesothelin-specific CD8(+) T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients. *J Exp Med* 2004; 200 (3): 297–306.
75. Argani P, Rosty C, Reiter RE, Wilentz RE, Murugesan SR, Leach SD, et al. Discovery of new markers of cancer through serial analysis of gene expression: prostate stem cell antigen is overexpressed in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61 (11): 4320–4.
76. Swierczynski SL, Maitra A, Abraham SC, Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Cameron JL, et al. Analysis of novel tumor markers in pancreatic and biliary carcinomas using tissue microarrays. *Hum. Pathol* 2004; 35: 357–66.
77. Yousef GM, Borgono CA, Popalis C, Yacoub GM, Polymeris ME, Soosaipillai A, et al. In-silico analysis of kallikrein gene expression in pancreatic and colon cancers. *Anticancer Res* 2004; 24: 43–51.
78. Crnogorac-Jurcevic T, Missiaglia E, Blaveri E, Gangeswaran R, Jones M, Terris B, et al. Molecular alterations in pancreatic carcinoma: expression profiling shows that dysregulated expression of S100 genes is highly prevalent. *J Pathol* 2003; 201: 63–74.
79. Li D, Zhu J, Firozi PF, Abbruzzese JL, Evans DB, Cleary K, et al. Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9 (3): 991–7.
80. Sato N, Fukushima N, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, van Heek NT, Cameron JL, et al. Gene expression profiling identifies genes associated with invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Am J Pathol* 2004; 164: 903–14.
81. Van der Heijden MS, Brody JR, Gallmeier E, Cunningham SC, Dezentje DA, Shen D, et al. Functional defects in the Fanconi anemia pathway in pancreatic cancer cells. *Am J Pathol* 2004; 165 (2): 651–7.

Rad primljen: 15. 02. 2008.

Prihvaćen za štampu: 04. 03. 2008.