

lek. Julia Tuchalska-Czuroń

**BADANIE WYBRANYCH CZYNNIKÓW
PROGNOSTYCZNYCH W POPULACJI
PACJENTÓW Z OPERACYJNYM
PRZEWODOWYM GRUCZOLAKORAKIEM
TRZUSTKI.**

Rozprawa na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk
o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Promotor: dr hab. n. med. prof. CMKP Marek Durlik



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

Warszawa 2021

Składam serdeczne podziękowania...

Najbliższym

za inspirację i wsparcie

Promotorowi prof. CMKP dr hab. Markowi Durlikowi
za podarowaną szansę, okazane zaufanie i słowa motywacji

Współautorom:

prof. CMKP dr hab. Markowi Durlikowi

*Zespół Kliniczno-Badawczy Chirurgii Transplantacyjnej IMDiK
Klinika Chirurgii Gastroenterologicznej i Transplantologii CSKMSWiA CMKP*

dr Jackowi Lenartowi

Pracownia Farmakoneurochemii w Zakładzie Neurochemii IMDiK

dr Justynie Augustyniak

Pracownia Farmakoneurochemii w Zakładzie Neurochemii IMDiK

*za przyjacielską współpracę, która przyczyniła się do powstania przedstawionego
w rozprawie doktorskiej cyklu publikacji oraz otrzymania nowatorskich wyników
w innowacyjnym projekcie obejmującym czynniki prognostyczne w gruczolakoraku
przewodowym trzustki*

Kadrze Profesorskiej z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
za owocne rozmowy, ogromną serdeczność i wsparcie

Koleżankom z Zespołu Kliniczno-Badawczy Chirurgii Transplantacyjnej IMDiK
za wieloletnią współpracę

Spis treści:

<i>Lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej</i>	4
<i>Wykaz skrótów używanych w rozprawie doktorskiej</i>	6
<i>1. Streszczenie polskojęzyczne i anglojęzyczne</i>	10
<i>2. Innowacyjność rozprawy</i>	14
<i>3. Wstęp</i>	16
<i>4. Cel pracy i zadania badawcze</i>	27
<i>5. Zalety i ograniczenia metod badawczych użytych w pracach oryginalnych</i>	28
<i>6. Wyniki prac wchodzących w skład zbioru</i>	29
<i>7. Podsumowanie, wnioski i dyskusja</i>	40
<i>8. Bibliografia</i>	47
<i>9. Kopie publikacji wchodzących w skład zbioru</i>	59
<i>10. Pisemne oświadczenia autorów prac tworzących zbiór</i>	60

Lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie doktorskiej ukazały się w następujących publikacjach:

1. Is mitochondrial DNA copy number a good prognostic marker in resectable pancreatic cancer?

Tuchalska-Czuroń J, Lenart J, Augustyniak J, Durlik M.

Pancreatology. 2019 Jan;19(1):73-79. doi: 10.1016/j.pan.2018.11.009. Epub 2018 Nov 22.

PMID: 30528645

pięcioletni IF=3.266

2. Clinical value of tissue DNA integrity index in pancreatic cancer.

Tuchalska-Czuroń J, Lenart J, Augustyniak J, Durlik M.

Surgeon. 2020 Mar 7. pii: S1479-666X(20)30022-6. doi: 10.1016/j.surge.2019.10.008. [Epub ahead of print]

PMID: 32156475

pięcioletni IF=2.134

3. Ploidy and DNA index as prognostic factors in resected pancreatic ductal adenocarcinoma – a review of the literature.

Durlik M, Tuchalska-Czuroń J.

Prz Gastroenterol. 2014;9(6):313-6. doi: 10.5114/pg.2014.47892. Epub 2014 Dec 30. Review.

PMID: 25653724

pięcioletni IF=0

Badania, których wyniki przedstawiono w cyklu publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej finansowane były w ramach projektu KNOW (KNOW-17) realizowanego ze środków Unii Europejskiej oraz ze środków pochodzących z Fundacji przy Centralnym Szpitalu Klinicznym MSWiA w Warszawie.

Wykaz skrótów używanych w rozprawie doktorskiej.

ALU - (ang. *Alu elements*); element transpozycyjny (transpozon) należący do grupy *SINE* (ang. *Short Interspersed Nuclear Elements*);

AUC - (ang. area under the curve), pole pod krzywą;

ccfDNA - (ang. circulating cell free DNA), krążące wolne pozakomórkowe DNA;

CTC - (ang. circulating tumor cell), krążące komórki nowotworowe;

ctDNA - (ang. circulating tumor deoxyribonucleic acid), krążący nowotworowy kwas deoksyrybonukleinowy;

DII - (ang. DNA integrity index), indeks integralności DNA;

DNA - (ang. deoxyribonucleic acid), kwas deoksyrybonukleinowy;

EMT - (ang. epithelial-mesenchymal transition), przejście epitelialno-mezenchymalne;

G1 - rak wysokozróżnicowany (niski stopień złośliwości);

G2 - rak średniozróżnicowany (pośredni stopień złośliwości);

G3 - rak niskozróżnicowany (wysoki stopień złośliwości);

IPMNs - (ang. Intraductal papillary mucinous neoplasms), wewnątrzprzewodowe brodawkowe nowotwory śluzowe trzustki;

IQR - (ang. interquartile range), rozstęp międzykwartyłowy, różnica między trzecim a pierwszym kwartyłem;

LINES - (ang. *Long Interspersed Nuclear Elements*), grupa retrotranspozonów niezawierających sekwencji *LTR* (ang. *Long Terminal Repeats*);

LINE1 - *Long interspersed element (LINE) 1* retrotranspozon niezawierający sekwencji *LTR* (ang. *Long Terminal Repeats*) należący do grupy *LINES*;

MCNs - (ang. Pancreatic mucinous cystic neoplasm), nowotwory śluzowe torbielowate trzustki;

mtCN - (ang. mitochondrial DNA copy number), liczba kopii DNA mitochondrialnego;

mtDNA – (ang. mitochondrial DNA), DNA mitochondrialny;

N0 - węzły chłonne bez przerzutów;

N1 - przerzuty do węzłów chłonnych;

ND1 - (ang. *Mitochondrially Encoded NADH, Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 1*), gen kodujący podjednostkę 1 dehydrogenazy NADH;

nDNA - (ang. nuclear DNA), DNA jądrowy;

NX – sytuacja, w której nie można ocenić obecności przerzutów do węzłów chłonnych;

NS - (ang. not statistically significant), nieistotne statystycznie;

PanIN - (ang. Pancreatic intraepithelial neoplasia), śród nabłonkowa neoplazja trzustkowa;

PC - (ang. pancreatic cancer), rak trzustki;

PCR - (ang. Polymerase Chain Reaction), reakcja łańcuchowa polimerazy;

PDAC - (ang. pancreatic ductal adenocarcinoma), gruczolakorak trzustki;

pz – para zasad;

qPCR – (ang. quantitative reverse transcription PCR), ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy;

R0 - ujemny margines chirurgiczny;

R1 – mikroskopowo dodatni margines chirurgiczny;

real-time PCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy;

ROC - (ang. receiver operating characteristic); narzędzie statystyczne służące do oceny poprawności klasyfikatora;

RM - (ang. resection margin), margines chirurgiczny;

SINEs – (ang. *Short Interspersed Elements*), grupa retrotranspozonów niezawierających sekwencji *LTR* (ang. *Long Terminal Repeats*);

SLCO2B1 - (ang. *Solute Carrier Organic Anion Transporter Family, member 2B1*), gen kodujący polipeptyd transportujący aniony organiczne 2B1;

T2 - guz ograniczony do trzustki o największym wymiarze > 2 cm;

T3 - guz wykraczający poza trzustkę nienaciekający pnia trzewnego ani tętnicy kręzkowej górnej;

T4 - guz wykraczający poza trzustkę naciekający pień trzewny lub tętnicę krękową górną;

TX – sytuacja, w której nie można ocenić guza pierwotnego.

1.1 Streszczenie.

Większość przypadków raka trzustki stanowi gruczolakorak trzustki, charakteryzujący się niekorzystnym rokowaniem i niską medianą czasu przeżycia. Rozprawę doktorską stanowi cykl trzech publikacji, które łączy zagadnienie czynników prognostycznych w populacji pacjentów z gruczolakorakiem trzustki.

W pracach oryginalnych badano wartość prognostyczną czynników dotąd nie badanych w tkance gruczolakoraków trzustki, takich jak względna liczba kopii DNA mitochondrialnego (z ang. relative mtDNA copy number) oraz indeks integralności DNA (z ang. DNA integrity index). Oba parametry były wyliczane na podstawie danych uzyskanych z użyciem ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (z ang. qPCR, real-time PCR). Próbkę guzów pochodziły od pacjentów z potwierdzonym histopatologicznie gruczolakorakiem przewodowym trzustki, zaś próbki kontrolne pochodziły z otaczającej tkanki trzustkowej marginesu chirurgicznego. Wykazaliśmy, że względna liczba kopii mitochondrialnego DNA z tkanki gruczolakoraka trzustki jest istotnie statystycznie niższa niż względna liczba kopii mitochondrialnego DNA z otaczającej tkanki trzustkowej ($P < 0.001$). Następnie wykazaliśmy istotny statystycznie spadek względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego wraz ze zmniejszającym się stopniem zróżnicowania histopatologicznego ($P < 0.001$). Ponadto wykazano, że próbki pochodzące z guzów, które w badaniu histopatologicznym zostały oznaczone jako R1 (z uwagi na obecność komórek nowotworowych w marginesie chirurgicznym) miały istotnie statystycznie wyższy indeks integralności DNA wyrażony jako stosunek $LINE1\ 300/79$ niż próbki pochodzące z kontrolnej otaczającej tkanki trzustkowej ($P < 0.05$). Ponadto wykazano, że indeks integralności DNA (DII) wyrażony jako stosunek $LINE1\ 300/79$ jest dobrym parametrem różnicującym guzy R1 od otaczającej tkanki trzustkowej ($P < 0.05$), a także od guzów R0. W badaniach nie udało się dowieść wartości prognostycznej względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego ani wartości prognostycznej indeksu integralności DNA w populacji pacjentów z gruczolakorakiem

przewodowym trzustki.

Ostatnia praca cyklu ma charakter przeglądowny i dotyczy wartości prognostycznej parametrów cytometrycznych takich jak ploidia i indeks DNA w populacji pacjentów z operacyjnym gruczolakiem trzustki. Wyniki przedstawionych badań wskazują, że indeks DNA oznaczany z użyciem cytometrii statycznej jest silnym czynnikiem prognostycznym w populacji pacjentów z gruczolakiem trzustki. Natomiast, przedstawione badania nad indeksem DNA oznaczanym z użyciem cytometrii przepływowej dostarczyły sprzecznych wyników. Po części można to tłumaczyć faktem, iż większość z tych badań miała charakter retrospektywny i była oparta na archiwalnych bloczkach parafinowych.

1.2 Abstract.

Most pancreatic cancer cases are pancreatic adenocarcinomas with poor prognosis and a low median survival. The doctoral dissertation is a series of three publications that combine the issue of prognostic factors in the population of patients with pancreatic adenocarcinoma.

In the original studies, the prognostic value of factors not previously studied in the tissue of pancreatic adenocarcinomas, such as relative mtDNA copy number and DNA integrity index, were investigated. Both parameters were calculated from the data obtained by the quantitative PCR-based assay. The tumors samples originated from the patients with pathologically confirmed pancreatic ductal adenocarcinoma and the control adjacent pancreatic tissue specimens were received from surgical margins. We provided the first evidence that mitochondrial DNA (mtDNA) copy number is significantly lower in pancreatic cancer tissue ($P < 0.001$) compared to adjacent normal pancreatic tissue. Next, we demonstrated a significant decrease in median mtDNA copy number across the differentiation. Furthermore we showed that specimens from the tumors pathologically marked as R1 (microscopic residual tumor) had a significantly higher *LINE1 300/79* ratio values than specimens from adjacent normal pancreatic tissue ($P < 0.05$) and *LINE1 300/79* ratio is a good parameter to distinguish between R0 and R1 tumors. The survival analyses in both studies failed to show a significant prognostic value for neither mtDNA copy number nor DNA integrity index.

The last paper of the cycle is a review and concerns the prognostic value of cytometric parameters such as ploidy and DNA index within the population of patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. The results of the presented studies indicate that the DNA index determined with the use of static image cytometry is a strong prognostic factor in the population of patients with pancreatic adenocarcinoma. However, the presented studies on the DNA index

determined with the use of flow cytometry provided contradictory results. Most of these studies were retrospective and based on archival paraffin-embended samples. Therefore they delivered only limited evidence.

2. Innowacyjność rozprawy.

Obserwacje wykraczające poza aktualną wiedzę literaturową zawarte w pracy zatytułowanej „Is mitochondrial DNA copy number a good prognostic marker in resectable pancreatic cancer?”:

- określenie względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego w tkance resekcyjnych gruczolakoraków trzustki;
- porównanie wartości względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego z próbek pochodzących z tkanek resekcyjnych gruczolakoraków trzustki z wartościami z próbek pochodzących z tkanki trzustkowej;
- określenie korelacji pomiędzy względną liczbą kopii DNA mitochondrialnego a parametrami histopatologicznymi dla gruczolakoraka przewodowego trzustki;
- określenie korelacji pomiędzy wartością względną liczbą kopii DNA mitochondrialnego a długością przeżycia pacjentów z operacyjnym gruczolakorakiem przewodowym trzustki.

Obserwacje wykraczające poza aktualną wiedzę literaturową zawarte w pracy zatytułowanej „Clinical value of tissue DNA integrity index in pancreatic cancer”:

- określenie indeksu integralności DNA w tkance resekcyjnych gruczolakoraków trzustki;
- porównanie wartości indeksu integralności DNA z próbek pochodzących z tkanek resekcyjnych gruczolakoraków trzustki z wartościami z próbek pochodzących z tkanki trzustkowej;
- określenie korelacji pomiędzy indeksem integralności DNA a parametrami

histopatologicznymi dla gruczolaka przewodowego trzustki;

- określenie korelacji pomiędzy wartością indeksu integralności DNA mitochondrialnego a długością przeżycia pacjentów z operacyjnym gruczolakiem przewodowym trzustki.

Dodatkowe atuty projektów:

-połączenie metod diagnostyki molekularnej z wartością kliniczną pod postacią korelacji badanych parametrów z wynikami histopatologicznymi i przede wszystkim z długością przeżycia pacjentów z operacyjnym gruczolakiem trzustki;

-przeprowadzenie analiz na tkankach guzów, co pozwala na możliwie najlepszą ocenę, w porównaniu do badań opartych na liniach komórkowych, modelach zwierzęcych czy krwi obwodowej.

Wstęp

3.1 Rokowania w raku trzustki.

Według raportu GLOBOCAN, w 2018 roku w Polsce odnotowano 5786 nowych przypadków raka trzustki oraz 5715 przypadków zgonów z powodu tego nowotworu [1]. Zarówno w Polsce, jak i na świecie wskaźnik zgonów z powodu raka trzustki jest bliski wskaźnikowi zachorowalności [1,2]. W 2018 r. zarejestrowano na świecie 458918 nowych przypadków raka trzustki oraz 432242 zgony z powodu raka trzustki [3]. Dodatkowo, zapadalność na raka trzustki wciąż ma tendencję wzrostową [4].

Dziewięćdziesiąt procent nowotworów trzustki stanowi gruczolakorak trzustki (ang. pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) [5] o niekorzystnym rokowaniu. W momencie rozpoznania choroby jest ona nieoperacyjna w większości przypadków [6,7]. Siedemdziesiąt sześć procent chorych na gruczolakoraka trzustki umiera w ciągu jednego roku od postawienia diagnozy [8]. Zaledwie 15-20% pacjentów kwalifikuje się do operacji [6], jedynej metody, która w połączeniu z chemioterapią daje szanse na całkowite wyleczenie. Średni czas przeżycia dla pacjentów poddanych operacji z ujemnym marginesem chirurgicznym (resekcja R0) kształtuje się według danych literaturowych na poziomie 19,7-26,8 miesiąca, zaś dla pacjentów z mikroskopowo dodatnim marginesem chirurgicznym (resekcja R1) wynosi 14,3-17,7 miesiąca [9,10].

W ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci postępy w leczeniu raka trzustki były ograniczone. Pięcioletni wskaźnik przeżycia wzrósł z 2,5% (95% przedział ufności, 2,0–3,0) w latach 1975–1977 do 8,5% (95% przedział ufności, 8,0 –9,0) w latach 2006–2012 [4]. Figura 1. pochodzi z oficjalnej witryny internetowej stowarzyszenia Pancreatic Cancer Action i ilustruje trendy wskaźników 5-letniego przeżycia dla nowotworów o różnych lokalizacjach na przestrzeni dekad.

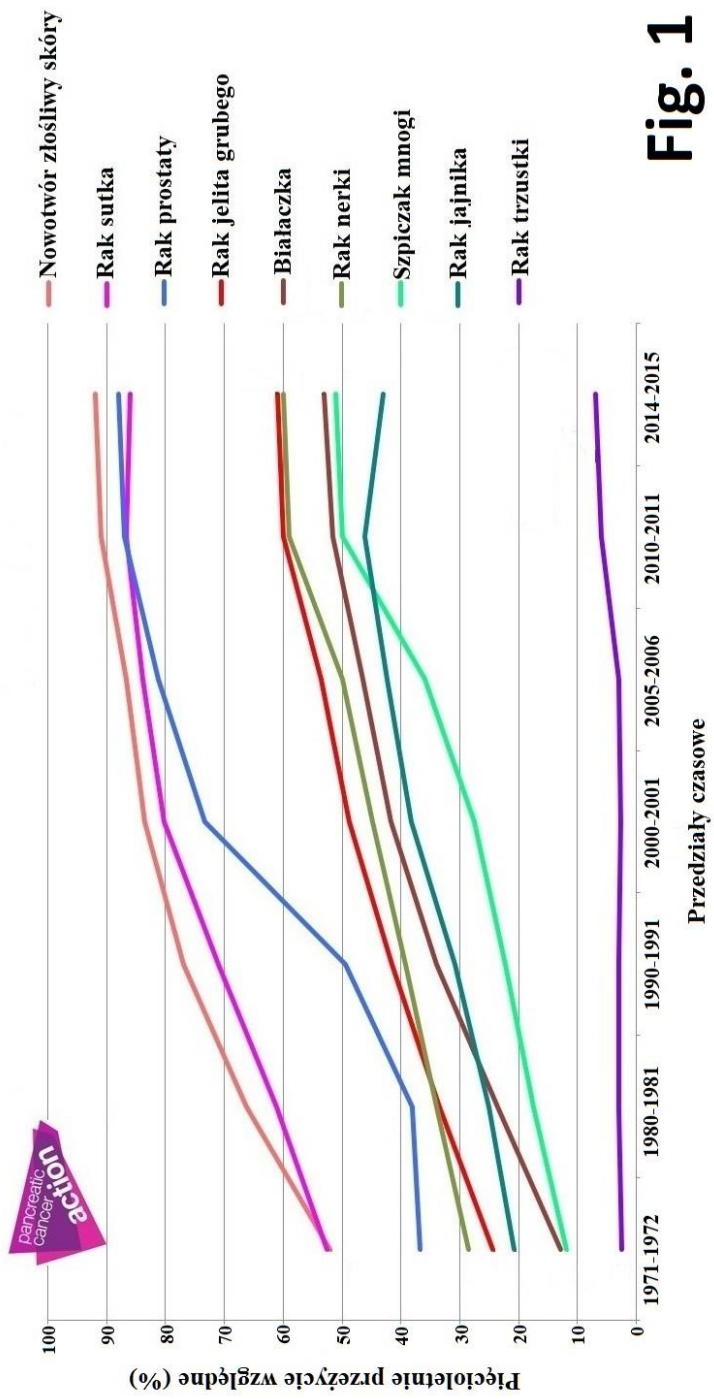


Fig. 1

Figura 1. Trendy wskaźników 5-letniego przeżycia dla nowotworów o różnych lokalizacjach na przestrzeni dekad

W obliczu niekorzystnych rokowań w raku trzustki i dużej liczby nowych projektów badawczych w zakresie jego terapii, szczególne miejsce zajmują badania nad wczesnym wykrywaniem raka trzustki oraz czynnikami prognostycznymi i predykcyjnymi u pacjentów z już rozpoznaną chorobą. Podczas studiów doktoranckich moje prace koncentrowały się wokół czynników prognostycznych w populacji pacjentów z operacyjnym gruczolakorakiem trzustki: zarówno nad oceną wartości prognostycznej czynników już poznanych w warunkach wybranego pojedynczego ośrodka, a także na poszukiwaniu nowych czynników prognostycznych. W rozprawie doktorskiej zawarłam wyniki najciekawszych i innowacyjnych projektów. Rozprawę stanowi cykl trzech publikacji: dwie prace oryginalne i jedna przeglądowa.

3.2 Liczba DNA mitochondrialnego w raku trzustki.

Pierwsza praca oryginalna nosi tytuł: „Is mitochondrial DNA copy number a good prognostic marker in resectable pancreatic cancer?”. Jest to pierwsza w literaturze praca na temat względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego w tkance resekcyjnych gruczolakoraków trzustki.

Mitochondria są samoreprodukującymi się organelami w cytoplazmie komórek eukariotycznych, które posiadają własny pozajądrowy materiał genetyczny. Liczba kopii DNA mitochondrialnego (mtDNA) przypadająca na jedno mitochondrium wynosi od 1 do 15, a średnia osiąga prawie 5. Każda komórka ludzka zawiera około 100 mitochondriów, co daje całkowitą przybliżoną liczbę molekuł mtDNA na komórkę ludzką około 500 [11].

W porównaniu z genomowym DNA nuklearnym, mtDNA cechuje szybsze tempo mutacji spowodowane ciągłą ekspozycją na mutagenne rodniki tlenowe, brak ochronnych mechanizmów naprawy DNA oraz brak histonów. Potencjalny związek pomiędzy większą częstością mutacji mtDNA a patofizjologią różnych schorzeń jest często badanym zagadnieniem [12,13]. Zidentyfikowano kilka rodzajów zmian dotyczących mtDNA w ludzkich nowotworach. Wśród nich, mutacje punktowe i zmiany liczby kopii są dwiema najczęstszymi zmianami. Różnego rodzaju mutacje genowe mtDNA

stwierdzono w nowotworach hematologicznych [14,15] i guzach litych, takich jak rak wątrobowokomórkowy, rak piersi, żołądka, prostaty i jelita grubego [16]. Równolegle zaobserwowano także zmiany ilościowe mtDNA w niektórych typach nowotworów [12]. Wzrost zawartości mtDNA stwierdzono w gruczolakoraku płuc i raku brodawkowatym tarczycy [12,17], zaś zmniejszenie w raku pęcherza, piersi, przełyku, nerek i wątroby [12,18,19]. W związku z tymi doniesieniami (popartymi także badaniami *in vitro* [20-22]), wysunięto wniosek, że zmiana liczby kopii mtDNA jest związana z kancerogenezą, a zatem czynnik ten może mieć zastosowanie kliniczne, szczególnie jako biomarker i czynnik prognostyczny. W literaturze medycznej badania koncentrują się wokół liczby kopii mtDNA w leukocytach krwi obwodowej lub w tkance nowotworowej. W odniesieniu do biomarkera nowotworowego, zwiększona liczba kopii mtDNA we krwi obwodowej była powiązana ze zwiększonym ryzykiem raka nerki, raka piersi, żołądka i jelita grubego, czerniaka i glejaków [23-27]. Odmienną korelację zanotowano w przypadku gruczolakoraka przełyku, raka pęcherza i raków skóry (non-melanoma skin cancer), gdzie zmniejszona liczba kopii mtDNA we krwi obwodowej była powiązana ze zwiększonym ryzykiem zachorowania [28,29]. Zależność między liczbą kopii mtDNA krwi obwodowej a ryzykiem nowotworzenia badano również w przypadku raka trzustki [30]. W tym badaniu wyższa liczba kopii mtDNA była istotnie związana ze zwiększonym ryzykiem raka trzustki. Pod względem czynnika prognostycznego niska liczba kopii mitochondrialnego DNA w tkance guza była skorelowana z gorszym rokowaniem u pacjentów z rakiem piersi [31]. Podobnie, zwiększone poziomy liczby mtDNA w tkance guza związane były z lepszym przeżywaniem w raku nadnerczy, raku nerkowokomórkowym chromochłonnym i nerwiaku o niskim stopniu złośliwości [12]. Odwrotny trend, polegający na krótszym przeżyciu u pacjentów z wyższymi wartościami mtDNA w tkance guza, odnotowano w przypadku jasnokomórkowego raka nerki, raka szyjki macicy i czerniaka [12,32].

W przedstawionej publikacji zastosowano metodę PCR w czasie rzeczywistym dla zsynchronizowanej kwantyfikacji jądrowego DNA (nDNA) i mtDNA w tkankach pochodzących z guza oraz otaczającej tkanki trzustkowej od pacjentów z resekcyjnym gruczolakorakiem trzustki.

Wyniki wyrażono jako względny stosunek ilości mitochondrialnego DNA do jądrowego DNA. Według dostępnej literatury, jest to pierwsze badanie, w którym w oparciu o qPCR dokonano analizy liczby kopii mitochondrialnego DNA (mtCN) w tkance gruczolakoraka trzustki (PC), sprawdzono korelację między mtCN a parametrami histopatologicznymi i długością przeżycia.

3.3 Indeks integralności DNA w raku trzustki.

Kolejna praca oryginalna nosi tytuł: „Clinical value of tissue DNA integrity index in pancreatic cancer.” Jest to pierwsza w literaturze praca na temat indeksu integralności DNA w tkance gruczolakoraka przewodowego trzustki.

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) jest cząsteczką, która może znajdować się zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz komórki (z ang. cell-free DNA). DNA pozakomórkowe można znaleźć we krwi, a także w innych płynach biologicznych. Zdegradowane fragmenty DNA uwolnione do osocza krwi nazywane są krążącym DNA pozakomórkowym (z ang. circulating cell-free DNA, ccfDNA) i pochodzą przede wszystkim z komórek apoptotycznych i z komórek nekrotycznych. O pochodzeniu ccfDNA informuje długość fragmentów DNA a także stosunek ilości dłuższych do krótszych fragmentów DNA [33]. Apoptoza komórek jest procesem naturalnym, w wyniku którego powstają małe fragmenty DNA o podobnej długości 185-200 par zasad. Dla kontrastu, w wyniku procesu martwicy guza nowotworowego powstają fragmenty DNA o różnej długości, generalnie powyżej 200 par zasad [34]. Krążące DNA nowotworowe (z ang. circulating tumor DNA, ctDNA) to obecne w krwiobiegu pofragmentowane cząsteczki DNA pochodzenia nowotworowego. CtDNA może pochodzić bezpośrednio z guza lub z krążących komórek nowotworowych (z ang. circulating tumor cells, CTC) [35].

Indeks integralności DNA (z ang. DNA integrity index, DII) jest względnym stosunkiem ilości dłuższych fragmentów DNA do fragmentów krótszych. W onkologii DII służy jako marker wczesnego wykrywania, odpowiedzi na leczenie i rokowania dla pacjentów z rakiem [36]. W dostępnej literaturze

raportowano, że DII jest pomocnym biomarkerem do wykrywania: raka wątrobowokomórkowego, raka jelita grubego, raka gruczołu krokowego, ostrej białaczki szpikowej (AML), raka piersi i czerniaka [37-43]. Ponadto, wykazano przydatność indeksu integralności DNA w monitorowaniu odpowiedzi na terapię w raku odbyticy i raku jamy nosowo-gardłowej [44,45]. W licznych badaniach wskazywano również na indeks integralności DNA (oznaczany z krwi) jako na potencjalny czynnik prognostyczny w przypadku takich nowotworów jak chłoniak, rak wątrobowokomórkowy, rak jelita grubego, piersi i płuc [34, 37, 46-49].

Analiza indeksu integralności DNA może być przeprowadzona na podstawie krążącego w krwiobiegu DNA nowotworowego (z ang. liquid biopsy) lub DNA pochodzącego bezpośrednio z tkanki nowotworowej uzyskanej drogą resekcji lub biopsji [50]. W wyniku martwicy powstają na ogół dłuższe fragmenty DNA. Dlatego zmiany wartości indeksu integralności DNA (DII) obserwowane we krwi powinny odzwierciedlać zmiany na poziomie tkanki guza.

DII jest najczęściej oznaczany na podstawie ampliconów *ALU* i/lub *LINE1*. Sekwencje *ALU* są rozproszone w całym genomie ludzkim. Ich znaczna liczba kopii stanowi prawie 11% ludzkiego genomu [51]. Sekwencje te są silnie konserwowane ewolucyjnie w genomach naczelnych. Są to transpozony o długości około 300 par zasad, należące do klasy transpozonów RNA (retroelementów) o typie *non-LTR* (nieposiadające sekwencji *LTR* – z ang. Long Terminal Repeats) z grupy *SINE* (z ang. Short Interspersed Nuclear Elements). *SINE* nie kodują funkcjonalnych białek, tak więc do procesu transpozycji wykorzystują inne retrotranspozony (np. *LINE*) [52,53]. Elementy *LINE* (z ang. Long Interspersed Nuclear Elements) to transpozony I klasy (retrotranspozony) o typie *non-LTR* i długości około 6000 par zasad, które stanowią 20% ludzkiego genomu. Sekwencje *LINE* wykazują zdolność do autotranspozycji, mogą także powielać sekwencje *ALU*. Do tej pory *ALU* i *LINE1* były opisywane jako najobficiej występujące sekwencje w ludzkim genomie, z odpowiednio około 1 200 000 i 520 000 kopiami w genomie [54]. Do oceny integralności DNA najczęściej stosuje się *ALU115* i *ALU247*, dwa amplicony o długości odpowiednio 115 i 247 pz, a także *LINE1 79* i *LINE1 300*, dwa amplicony o

długości odpowiednio 79 i 300 pz. Analiza *ALU*, *LINE1* z wykorzystaniem qPCR jest najczęściej stosowaną metodą wykrywania wskaźnika integralności DNA [55, 56].

Celem pracy było zbadanie indeksu integralności DNA (DII) w tkankach pochodzących z guza oraz otaczającej tkanki trzustkowej od pacjentów z resekcyjnym gruczolakorakiem trzustki oraz zbadanie korelacji między DII tkanki nowotworowej a parametrami klinicznymi, histopatologicznymi oraz całkowitym przeżyciem. W tym prospektywnym badaniu oceniliśmy wskaźnik integralności DNA, stosując: stosunek *ALU* (wyniki qPCR dla *ALU227* / *ALU115* pz), współczynnik *LINE1* (wyniki qPCR dla *LINE1 300* / *LINE1 79* pz) i średnią z powyższych wartości. Ideą badania było sprawdzenie klinicznej wartości indeksu integralności DNA u pacjentów z rakiem trzustki. Istnieje wiele badań, w których analizowano integralność DNA we krwi, ale nie bezpośrednio w tkance nowotworowej. Według naszej wiedzy jest to pierwsze badanie opisujące indeks integralności DNA w tkance raka trzustki.

3.4 Ploidia i indeks DNA w raku trzustki.

Ploidia jest to liczba zestawów chromosomów w jądrze komórkowym. Dotyczy to komórek somatycznych znajdujących się w fazie G₀ / G₁ mitotycznego cyklu komórkowego. Typowa prawidłowo zbudowana ludzka komórka somatyczna zawiera 46 chromosomów, co stanowi całkowitą wielokrotność liczby monoploidalnej 23 ($2n = 46$) [57]. Wyróżniamy następujące typy rozkładów ploidii w komórkach: rozkład haploidalny (haploid, 1 zestaw), rozkład diploidalny (diploid, 2 zestawy), triploid (3 zestawy), tetraploid (4 zestawy), pentaploid (5 zestawów), heksaploid (6 zestawów), itd. Ogólny termin poliploid/rozkład poliploidalny jest używany do opisu komórek z trzema lub więcej zestawami chromosomów. Euploidia jest to stan komórki (lub organizmu) mającej całkowitą wielokrotność liczby monoploidalnej, zaś aneuploidia to stan braku euploidii [58].

Indeks DNA jest to stosunek średniej zawartości DNA jądrowego komórek w fazie G₀/G₁ pochodzących z badanej tkanki (np. tkanki guza) do średniej zawartości DNA jądrowego znanych

komórek o rozkładzie diploidalnym [57].

Cytometria statyczna i przepływowa to metody służące do oznaczania ploidii i indeksu DNA. W cytometrii przepływowej średnia zawartość DNA jądrowego jest wyznaczana na podstawie nasilenia fluorescencji materiału genetycznego pochodzącego z komórek w fazie G₀/G₁. Graficznym przedstawieniem rozkładu ploidii w badanej populacji jest histogram DNA, a jednym z parametrów indeks DNA [59].

Ploidia i związany z nią indeks DNA są uważane za parametry rokownicze w wielu typach nowotworów, m.in. w raku piersi, jelita grubego, gruczołu krokowego, w raku żołądka, szyjki i trzonu macicy [59-63]. Wyniki przedstawionych badań wskazują, że indeks DNA oznaczany z użyciem cytometrii statycznej jest silnym czynnikiem prognostycznym w populacji pacjentów z gruczolakorakiem trzustki. Jednakże badania nad ploidią i indeksem DNA oznaczanych metodą cytometrii przepływowej bazują w większości na próbkach pochodzących z bloczków parafinowych, cechują się niejednorodną metodologią, a ich wyniki bywają sprzeczne [64-67].

Poniżej przedstawiono badania dotyczące związku między przeżywalnością pacjentów z resekcyjnym gruczolakorakiem przewodowym trzustki a ich wskaźnikiem ploidii / indeksu DNA. Wyniki podobnych badań podsumowano w tabeli I.

Autorzy	Charakter badania	Metoda	Metoda	Liczba pacjentów	Guzy diploidalne [%]	Guzy niediploidalne [%]	Przeżycie w grupie diploidanej [miesiące]	Przeżycie w grupie niediploidanej [miesiące]	Wartość p	Indeks DNA	Wartość p
Kamphues et al.	Prospekt.	Cytometria statyczna	Cytometria statyczna	61	24.6	75.4	29.2	13.5	0.252	1.0-2.5	0.026
Yeo et al.	Retrospekt.	Cytometria przeply-wowowa	Cytometria przeply-wowowa	119	43	57	24	11.5	0.0002	-	-
Berczi et al.	Retrospekt.	Cytometria przeply-wowowa	Cytometria przeply-wowowa	22	63.6	36.4	10	8	>0.05	-	-
Bui et al.	Retrospekt.	Cytometria przeply-wowowa	Cytometria przeply-wowowa	20	35	65	17	7.5	<0.03	-	-
Hyofy et al.	Retrospekt.	Cytometria przeply-wowowa	Cytometria przeply-wowowa	53	79	21	14	9	0.11	1.0-3.21	-
Klein et al. *	Retrospekt.	Cytometria statyczna	Cytometria statyczna	143	50	50	29.2	16.6	0.011	1.0-2.7	0.011
Allison et al.	Retrospekt.	Cytometria przeply-wowowa	Cytometria przeply-wowowa	47	40	60	25	10.5	0.003	-	-

Tabela 1.: Zestawienie badań nad ploidią i indeksem DNA w raku trzustki.

4. Cel pracy i zadania badawcze.

4.1 Cel pracy.

Ocena wybranych czynników prognostycznych w populacji pacjentów z operacyjnym przewodowym gruczolakiem trzustki.

4.2 Zadania badawcze służące realizacji celu.

- Oznaczenie względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego w tkance resekcyjnych gruczolakoraków trzustki i w kontrolnych tkankach trzustkowych.
- Ocena korelacji między względną liczbą kopii DNA mitochondrialnego a wartościami parametrów histopatologicznych oraz długością przeżycia pacjentów z operacyjnym gruczolakiem przewodowym trzustki.
- Oznaczenie indeksu integralności DNA w tkance resekcyjnych gruczolakoraków trzustki i w kontrolnych tkankach trzustkowych.
- Ocena korelacji między indeksem integralności DNA a wartościami parametrów histopatologicznych oraz długością przeżycia pacjentów z operacyjnym gruczolakiem przewodowym trzustki.

5. Zalety i ograniczenia metod badawczych użytych w pracach oryginalnych.

Zalety i ograniczenia ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy.

Zalety ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy:

- umożliwia oszacowanie początkowej liczby cząsteczek DNA;
- pozwala na szybką analizę ilości produktu;
- wysoka czułość i specyficzność.

Ograniczenia metody ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy:

- wymaga specjalnie przystosowanego termocyklera;
- badania, sprzęt i odczynniki konieczne do analizy nie są tanie;
- metoda wymaga doświadczenia, specjalistycznej wiedzy i przeszkolenia zespołu wykonującego analizy;
- nieprawidłowości na którymkolwiek etapie projektowania testu (wybór odpowiednich sekwencji sondy i starterów, dobór warunków reakcji, określenie specyficzności reakcji) mogą skutkować otrzymaniem zafałszowanych wyników.

6. Wyniki prac wchodzących w skład zbioru.

6.1 Wyniki pracy „Is mitochondrial DNA copy number a good prognostic marker in resectable pancreatic cancer?”

6.1.1 Charakterystyka pacjentów biorących udział w badaniu.

Wyniki otrzymano z 74 próbek (43 z tkanki gruczolaka przewodowego trzustki, 31 z otaczającej kontrolnej tkanki trzustkowej). Średnia wieku w grupie gruczolaka przewodowego trzustki wynosiła 63.44 lat (w zakresie od 40 do 84), zaś w grupie kontrolnej otaczającej tkanki trzustkowej wynosiła 64.10 lat (w zakresie od 37 do 84). W grupie gruczolaka trzustki było 44.19% kobiet i 55.81% mężczyzn. W grupie kontrolnej było 48.39% kobiet i 51.61% mężczyzn. W tabeli 2. podsumowano podstawową charakterystykę włączonych do badania pacjentów [69]. Pomiędzy grupami nie było istotnych statystycznie różnic w zakresie wieku, pochodzenia etnicznego i płci [69].

Charakterystyka	Grupa gruczolaka (n=43) N (%)	Grupa kontrolna (n=31) N (%)	Wartość P
Etniczność Rasa biała	43 (100.0)	31 (100.0)	ns
Płeć Mężczyźni Kobiety	24 (55.81) 19 (44.19)	16 (51.61) 15 (48.39)	ns ns
Wiek (średnia; lata)	63.44	64.10	ns

Tabela 2. Podstawowa charakterystyka włączonych do badania pacjentów; ns - (ang. not statistically significant), nieistotne statystycznie, ns – $P > 0.05$.

Tabela 3. zestawia podstawowe parametry histopatologiczne badanych guzów gruczolakoraka przewodowego trzustki, takie jak stopień rozrostu guza, zajęcie regionalnych węzłów chłonnych, stopień zróżnicowania histopatologicznego, lokalizację w zakresie trzustki oraz stan marginesu chirurgicznego [69].

Parametry histopatologiczne	Grupa gruczolakoraka trzustki (n=43) N (%)
Rozległość guza pierwotnego	
T2	2 (4.65)
T3	38 (88.37)
T4 (typ borderline)	3 (6.98)
Zajęcie węzłów chłonnych	
N0	5 (11.63)
N1	37 (86.05)
nieokreślone	1 (2.33)
Stopień zróżnicowania histologicznego	
G1	9 (20.93)
G2	29 (67.44)
G3	4 (9.30)
nieokreślony	1 (2.33)
Położenie guza w obrębie trzustki	
Głowa	36 (83.72)
Pogranicze głowy i trzonu	3 (6.98)
Pogranicze trzonu i ogona	2 (4.65)
Inne	2 (4.65)
Status marginesu chirurgicznego	
R0	15 (34.88)
R1	27 (62.79)
nieokreślony	1 (2.33)

Tabela 3. Podstawowe parametry histopatologiczne badanych guzów gruczolakoraka przewodowego trzustki.

6.1.2 Określenie względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego jako stosunku *ND1/SLO2B1*, w tkankach pochodzących z gruczolaka trzustki oraz z otaczającej tkanki trzustkowej.

Mediana względnej liczby kopii mitochondrialnego DNA w 43 próbkach pochodzących z tkanek gruczolaka przewodowego trzustki była równa 123, zaś rozstęp ćwiartkowy wyniósł 75. Mediana względnej liczby kopii mitochondrialnego DNA w 31 próbkach pochodzących z kontrolnych otaczających tkanek trzustkowych była równa 195, zaś rozstęp ćwiartkowy wyniósł 462. Względna liczba kopii mitochondrialnego DNA z tkanki gruczolaka trzustki była istotnie statystycznie niższa niż względna liczba kopii mitochondrialnego DNA z otaczającej tkanki trzustkowej ($P < 0.001$) [69] (*Fig. 1A*). W grupie gruczolaka trzustki, dla większości guzów zanotowano względną liczbę kopii DNA mitochondrialnego w zakresie od 50 do 200 [69] (*Fig. 1B*). W badanej populacji było 7 par próbek (tkanka guza i otaczająca kontrolna tkanka trzustkowa). Także w tej podgrupie względna liczba kopii mitochondrialnego DNA z tkanki gruczolaka trzustki była istotnie statystycznie niższa niż względna liczba kopii mitochondrialnego DNA z otaczającej tkanki trzustkowej ($P > 0.05$) [69] (*Fig. 4 w Suplemencie*).

6.1.3 Określenie korelacji pomiędzy względną liczbą kopii DNA mitochondrialnego a parametrami histopatologicznymi w grupie gruczolaka trzustki.

Względna liczba kopii mitochondrialnego DNA z tkanki gruczolaka trzustki była istotnie statystycznie niższa niż względna liczba kopii mitochondrialnego DNA z otaczającej tkanki trzustkowej ($P < 0.001$). Co więcej, zaobserwowano spadek względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego wraz ze zmniejszającym się stopniem zróżnicowania histopatologicznego. Test trendu Jonckheere-Terpstra wykazał istotność statystyczną dla tego trendu (w kolejności: kontrolna otaczająca tkanka trzustkowa, guzy wysokozróżnicowane (G1), guzy średniozróżnicowane (G2), guzy

niskozróżnicowane (G3), $P < 0.001$). Ponadto, podgrupa guzów G2 miała istotnie statystycznie niższą względną liczbę kopii mitochondrialnego DNA w porównaniu z kontrolną otaczającą tkanką trzustkową, $P < 0.01$ [69] (*Fig.2A*). W kontekście zajęcia węzłów chłonnych, badanie nie dowiodło istotnej statystycznie różnicy względnej liczby kopii mitochondrialnego DNA pomiędzy guzami N0 (dla których badanie histopatologiczne nie wykazało przerzutów do węzłów chłonnych) a guzami N1 (przerzutującymi do węzłów chłonnych) [69] (*Fig.2B*). W zakresie statusu marginesu chirurgicznego, zarówno próbki pochodzące z guzów R0 (dla których badanie histopatologiczne nie wykazało komórek nowotworowych w marginesie chirurgicznym), jak i próbki pochodzące z guzów R1 (mikroskopowo widoczne komórki nowotworowe w marginesie chirurgicznym) miały istotnie statystycznie niższą wartość względnej liczby kopii mitochondrialnego DNA w porównaniu z otaczającą kontrolną tkanką trzustkową ($P < 0.05$), co nie było zaskakujące zważywszy na fakt, że próbki z wszystkich guzów miały istotnie statystycznie niższą wartość względnej liczby kopii mitochondrialnego DNA w porównaniu z otaczającą kontrolną tkanką trzustkową. Badanie nie dowiodło istotnej statystycznie różnicy względnej liczby kopii mitochondrialnego DNA pomiędzy guzami R0 a guzami R1 [69] (*Fig.2C*). W odniesieniu do lokalizacji guza w obrębie trzustki, nie zanotowano istotnej statystycznie różnicy względnej liczby kopii mitochondrialnego DNA pomiędzy guzami położonymi w głowie trzustki a guzami o innych lokalizacjach [69] (*Fig.2D*).

6.1.4 Wpływ względnej liczby kopii mitochondrialnego DNA na długość przeżycia pacjentów z operacyjnym gruczolakorakiem przewodowym trzustki.

Aby określić optymalny punkt odcięcia wartości względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego (mtCN) dla raka, przeprowadzono analizę krzywej ROC (z ang. *ROC – Receiver Operating Characteristic*). Wartość pola pod krzywą (z ang. *area under the curve, AUC*) w odniesieniu do względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego wyniosła 0.742, zaś wyznaczony punkt odcięcia dla raka był równy 231, z czułością na poziomie 90.7% i swoistością 46.9% [69] (*Fig.3A*). W oparciu o wyliczony optymalny punkt odcięcia mtCN, pacjentów podzielono na 2 grupy: z niską ($mtCN \leq 231$)

i wysoką (mtCN>231) wartością względną liczby kopii DNA mitochondrialnego. Następnie przeprowadzono analizę przeżycia z wykorzystaniem metody Kaplana-Meiera, wyniki porównano z użyciem testu log-rank (Mantel-Cox). Badanie nie dowiodło wartości prognostycznej względną liczbę kopii DNA mitochondrialnego w populacji pacjentów z gruczolakorakiem przewodowym trzustki [69] (*Fig.3B*).

6.2 Wyniki pracy „Clinical value of tissue DNA integrity index in pancreatic cancer”.

6.2.1 Charakterystyka pacjentów biorących udział w badaniu.

Wyniki otrzymano z 73 próbek (42 z tkanki gruczolakoraka przewodowego trzustki, 31 z otaczającej kontrolnej tkanki trzustkowej). Średnia wieku w grupie gruczolaka przewodowego trzustki wynosiła 63.60 lat (w zakresie od 40 do 84), zaś w grupie kontrolnej otaczającej tkanki trzustkowej wynosiła 64.19 lat (w zakresie od 37 do 84). W grupie gruczolakoraka trzustki było 45.24% kobiet i 54.76% mężczyzn. W grupie kontrolnej było 48.39% kobiet i 51.61% mężczyzn. W tabeli 4. podsumowano podstawową charakterystykę włączonych do badania pacjentów [70]. Pomędzy grupami nie było istotnych statystycznie różnic w zakresie wieku, pochodzenia etnicznego i płci [70].

Charakterystyka	Grupa gruczolakoraka (n=42) N (%)	Grupa kontrolna (n=31) N (%)	Wartość P
Etniczność Rasa biała	42 (100.0)	31 (100.0)	ns
Płeć Mężczyźni Kobiety	23 (54.76) 19 (45.24)	16 (51.61) 15 (48.39)	ns ns
Wiek (średnia; lata)	63.60	64.19	ns

Tabela 4. Podstawowa charakterystyka włączonych do badania pacjentów. ns - (ang. not statistically significant), nieistotne statystycznie, ns – $P > 0.05$.

Tabela 5. zestawia podstawowe parametry histopatologiczne badanych guzów gruczolakoraka przewodowego trzustki, takie jak stopień rozrostu guza, zajęcie regionalnych węzłów chłonnych, stopień zróżnicowania histopatologicznego, lokalizację w zakresie trzustki, stan marginesu chirurgicznego oraz występowanie towarzyszących zmian przednowotworowych [70].

Parametry histopatologiczne oraz towarzyszące zmiany przednowotworowe	Grupa gruczolakoraka trzustki (n=42) N (%)
Rozległość guza pierwotnego	
T2	2 (4.76)
T3	38 (90.48)
T4 (typ borderline)	2 (4.76)
Zajęcie węzłów chłonnych	
N0	5 (11.90)
N1	36 (85.71)
nieokreślone	1 (2.38)
Stopień zróżnicowania histologicznego	
G1	9 (21.43)
G2	28 (66.66)
G3	4 (9.52)
nieokreślony	1 (2.38)
Położenie guza w obrębie trzustki	
Głowa	35 (83.33)
Pogranicze głowy i trzonu	3 (7.14)
Pogranicze trzonu i ogona	2 (4.76)
Inne	2 (4.76)
Status marginesu chirurgicznego	
R0	15 (35.71)
R1	26 (61.90)
nieokreślony	1 (2.38)
Towarzyszące zmiany przednowotworowe	
PanIN	12 (28.57)
IPMNs	3 (7.14)
MCNs	0 (0)

Tabela 5. Podstawowe parametry histopatologiczne badanych guzów gruczolakoraka przewodowego trzustki oraz występowanie towarzyszących zmian przednowotworowych; PanIN - (ang. Pancreatic intraepithelial neoplasia), śródnabłonkowa neoplazja trzustkowa; IPMNs - (ang. Intraductal papillary mucinous neoplasms), wewnątrzprzewodowe brodawkowe nowotwory śluzowe trzustki; MCNs - (ang. Pancreatic mucinous cystic neoplasm), nowotwory śluzowe torbielowate trzustki.

6.2.2 Określenie indeksu integralności DNA w tkance gruczolakoraka trzustki i w otaczającej tkance trzustkowej.

Indeks integralności DNA (z ang. DNA integrity index, DII) był obliczony z użyciem: stosunku *Alu247/115*, stosunku *LINE1 300/79* oraz średniej z powyższych wartości. Mediana indeksu integralności DNA wyrażonego jako stosunek *Alu247/115* w 42 próbkach pochodzących z tkanek gruczolakoraka przewodowego trzustki była równa 1.23, zaś rozstęp ćwiartkowy wyniósł 1.92. Mediana stosunku *Alu247/115* w 31 próbkach pochodzących z kontrolnych otaczających tkanek trzustkowych była równa 1.14, zaś rozstęp ćwiartkowy wyniósł 0.76. Mediana indeksu integralności DNA wyrażonego jako stosunek *LINE1 300/79* w próbkach pochodzących z tkanek gruczolakoraka przewodowego trzustki była równa 1.24, zaś rozstęp ćwiartkowy wyniósł 5.43. Mediana stosunku *LINE1 300/79* w próbkach pochodzących z kontrolnych otaczających tkanek trzustkowych była równa 0.87, zaś rozstęp ćwiartkowy wyniósł 3.67. Mediana indeksu integralności DNA rozumianego jako średnia z sumy stosunków *Alu247/115* i *LINE1 300/79* w próbkach pochodzących z tkanek gruczolakoraka przewodowego trzustki była równa 1.24, zaś rozstęp ćwiartkowy wyniósł 4.08. Mediana stosunku *LINE1 300/79* w próbkach pochodzących z kontrolnych otaczających tkanek trzustkowych była równa 1.03, zaś rozstęp ćwiartkowy wyniósł 2.43. Tkankowy indeks integralności DNA (rozumiany jako stosunek *Alu247/115*, stosunek *LINE1 300/79* oraz średnia z powyższych wartości) w grupie gruczolakoraka trzustki był wyższy niż w grupie kontrolnej otaczającej tkanki trzustkowej, jednak różnica nie była istotna statystycznie (P=0.72 dla stosunku *Alu*, P=0.09 dla stosunku *LINE1*, P=0.5 dla średniej z powyższych wartości) [70] (Fig.2A). Następnie przeprowadzono analizę krzywej ROC (z ang. ROC – Receiver Operating Characteristic), aby określić optymalny punkt odcięcia wartości indeksu integralności DNA (DII) dla raka. Wartość pola pod krzywą (z ang. area under the curve, AUC) w odniesieniu do indeksu integralności DNA wyrażonego jako stosunek *Alu247/115* wyniosła 0.525 (P=0.71), zaś wyznaczony punkt odcięcia był równy 1.7411, z czułością na poziomie 45.2% i swoistością 78.1% [70] (Fig.2B). Wartość pola pod krzywą (z ang. area under

the curve, AUC) w odniesieniu do indeksu integralności DNA wyrażonego jako stosunek *LINE1 300/79* wyniosła 0.6153 ($P=0.09$), zaś wyznaczony punkt odcięcia był równy 0.9054, z czułością na poziomie 71.4% i swoistością 59.4% [70] (*Fig.2C*). Jeśli chodzi o indeks integralności DNA wyrażony jako średnia z sumy stosunków *Alu247/115* i *LINE1 300/79*, to dla tak rozumianego indeksu integralności DNA wartość pola pod krzywą (z *ang. area under the curve, AUC*) wyniosła 0.546 ($P=0.50$), zaś wyznaczony punkt odcięcia był równy 1.1869, z czułością na poziomie 52.4% i swoistością 68.8% [70] (*Fig.2D*).

6.2.3 Określenie związku pomiędzy tkankowym indeksem integralności DNA a statusem marginesu chirurgicznego w grupie gruczolakoraka trzustki.

Próbki pochodzące z guzów, które w badaniu histopatologicznym zostały oznaczone jako R1 (z uwagi na obecność komórek nowotworowych w marginesie chirurgicznym) miały istotnie statystycznie wyższy stosunek *LINE1 300/79* (mediana 1.99, rozstęp ćwiartkowy 8.64) niż próbki pochodzące z kontrolnej otaczającej tkanki trzustkowej (mediana 0.87, rozstęp ćwiartkowy 3.67), $P<0.05$ [70] (*Fig.3A*). Następnie przeprowadzono analizę krzywej ROC (z *ang. ROC – Receiver Operating Characteristic*), aby określić optymalny punkt odcięcia wartości indeksu integralności DNA (DII) wyrażonego jako stosunek *LINE1 300/79*, który to punkt odcięcia pozwoli na rozróżnienie pomiędzy kontrolną otaczającą tkanką trzustkową a guzami R1. Wartość pola pod tą krzywą ROC (z *ang. area under the curve, AUC*) wyniosła 0.69 ($P<0.05$), zaś wyznaczony punkt odcięcia był równy 0.9054, z czułością na poziomie 84.6% i swoistością 59.4% [70] (*Fig.3B*). Ten sam punkt odcięcia wartości stosunku *LINE1 300/79* został wyznaczony na podstawie analizy krzywej ROC przeprowadzonej, aby zróżnicować guzy R1 od guzów R0 (mikroskopowo brak komórek nowotworowych w marginesie chirurgicznym). W tym przypadku wartość pola pod krzywą ROC (z *ang. area under the curve, AUC*) wyniosła 0.703 ($P<0.05$), czułość 84.6% i swoistość 57.1% [70] (*Fig.3B*).

6.2.4 Określenie związku pomiędzy tkankowym indeksem integralności DNA a pozostałymi parametrami histopatologicznymi w grupie gruczolakoraka przewodowego trzustki.

Tkankowy indeks integralności DNA (rozumiany jako stosunek *Alu247/115*, stosunek *LINE1 300/79* oraz średnia z powyższych wartości) w grupie gruczolakoraka trzustki był wyższy niż w grupie kontrolnej otaczającej tkanki trzustkowej, jednak różnica nie była istotna statystycznie ($P=0.72$ dla stosunku *Alu*, $P=0.09$ dla stosunku *LINE1*, $P=0.5$ dla średniej z powyższych wartości). W odniesieniu do stopnia zróżnicowania histopatologicznego, nie zanotowano istotnej różnicy w wartościach indeksu integralności DNA pomiędzy guzami z różnym stopniem zróżnicowania histopatologicznego. Mediany wartości stosunku *Alu247/115* dla guzów G1, G2, G3 wynosiły odpowiednio: 1.06, 1.62, 0.82, $P=0.94$. Mediany wartości stosunku *LINE1 300/79* dla guzów G1, G2, G3 wynosiły odpowiednio: 1.30, 1.57, 0.94, $P=0.31$. Mediany wartości indeksu integralności DNA rozumianego jako średnia z sumy stosunków *Alu247/115* i *LINE1 300/79* dla guzów G1, G2, G3 wynosiły odpowiednio: 1.14, 1.59, 0.88, $P=0.88$ [70] (*Fig. 4A*).

W kontekście zajęcia węzłów chłonnych, badanie nie dowiodło istotnej statystycznie różnicy w wartościach indeksu integralności DNA pomiędzy guzami N0 (dla których badanie histopatologiczne nie wykazało przerzutów do węzłów chłonnych) a guzami N1 (przerzutującymi do węzłów chłonnych). Mediany wartości stosunku *Alu247/115* dla guzów N1 i N0 wynosiły odpowiednio: 1.23 i 1.97, $P=0.80$. Mediany wartości stosunku *LINE1 300/79* dla guzów N1 i N0 wynosiły odpowiednio: 1.24 i 1.79, $P=0.68$. Mediany wartości indeksu integralności DNA rozumianego jako średnia z sumy stosunków *Alu247/115* i *LINE1 300/79* dla guzów N1 i N0 wynosiły odpowiednio: 1.24 i 1.88, $P=0.77$ [70] (*Fig. 4B*).

W odniesieniu do lokalizacji guza w obrębie trzustki, nie zanotowano istotnej różnicy w wartościach indeksu integralności DNA pomiędzy guzami położonymi w głowie trzustki a guzami w

pozostałych lokalizacjach. Mediany wartości stosunku *Alu247/115* dla guzów położonych w głowie trzustki i dla guzów w pozostałych lokalizacjach wynosiły odpowiednio: 1.60 i 0.73, $P=0.51$. Mediany wartości stosunku *LINE1 300/79* dla guzów położonych w głowie trzustki i dla guzów w pozostałych lokalizacjach wynosiły odpowiednio: 1.83 i 0.76, $P=0.31$. Mediany wartości indeksu integralności DNA rozumianego jako średnia z sumy stosunków *Alu247/115* i *LINE1 300/79* dla guzów położonych w głowie trzustki i dla guzów w pozostałych lokalizacjach wynosiły odpowiednio: 1.68 i 0.80, $P=0.51$ [70] (*Fig.4C*).

6.2.5 Wpływ tkankowego indeksu integralności DNA na długość przeżycia pacjentów z operacyjnym gruczolakorakiem przewodowym trzustki.

Aby określić optymalny punkt odcięcia wartości tkankowego indeksu integralności DNA (wyrażonego jako stosunek *Alu247/115*, stosunek *LINE1 300/79* oraz średnia z powyższych wartości) dla raka, przeprowadzono analizę krzywej ROC (z ang. *ROC – Receiver Operating Characteristic*). W oparciu o wygenerowane punkty odcięcia, pacjentów z grupy gruczolakoraka przewodowego trzustki podzielono na podgrupy z wyższymi i niższymi wartościami indeksu integralności DNA. Następnie przeprowadzono analizę przeżycia z wykorzystaniem metody Kaplana-Meiera, wyniki porównano z użyciem testu log-rank (Mantel-Cox). Badanie nie dowiodło wartości prognostycznej tkankowego indeksu integralności DNA w populacji pacjentów z gruczolakorakiem przewodowym trzustki [70] (*Fig.5*).

7. Podsumowanie, wnioski i dyskusja.

Pomimo postępów w leczeniu chirurgicznym i chemioterapeutycznym, jakie dokonały się w ostatnich latach, rokowanie chorych na raka trzustki jest bardzo złe. Dlatego też w wielu badaniach skupiono się na przyczynach dynamicznego przebiegu raka trzustki i wartości prognostycznej czynników możliwie najlepiej odzwierciedlających rozwój tego nowotworu. Badania oceniające wpływ prognostyczny ploidii i indeksu DNA przyniosły sprzeczne wyniki. Jednak większość z tych badań miała charakter retrospektywny i opierała się na analizie archiwalnych bloczków parafinowych, a zatem nie dostarczyły wystarczających dowodów potwierdzających lub wykluczających tezę o wartości prognostycznej ploidii czy indeksu DNA w populacji pacjentów z rakiem trzustki.

Praca zatytułowana „Is mitochondrial DNA a good prognostic marker in resectable pancreatic cancer?” jest pierwszą w literaturze pracą na temat względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego w tkance resekcyjnych gruczolakoraków przewodowych trzustki. W pracy dowiedziono, że względna liczba kopii mitochondrialnego DNA z tkanki gruczolakoraka trzustki jest istotnie statystycznie niższa niż względna liczba kopii mitochondrialnego DNA z otaczającej tkanki trzustkowej ($P < 0.001$) [69]. Ponadto wykazano istotny statystycznie spadek względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego wraz ze zmniejszającym się stopniem zróżnicowania histopatologicznego ($P < 0.001$) [69]. Badanie nie dowiodło korelacji pomiędzy względną liczbą kopii DNA mitochondrialnego a przerzutami do węzłów chłonnych, statusem marginesu chirurgicznego oraz lokalizacją guza w obrębie trzustki [69]. W badaniu nie udało się dowieść wartości prognostycznej względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego w populacji pacjentów z gruczolakorakiem przewodowym trzustki [69].

Wiadomo, że tkanki o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym (np. mięsień sercowy czy mięśnie szkieletowe) zawierają więcej kopii mitochondrialnego DNA w przeliczeniu na komórkę od tkanek o mniejszych wydatkach energetycznych (jak nerki, wątroba czy płuca) [12]. Ponadto wiadomo, że tkanka mięśniowa zwiększa zawartość mitochondriów pod wpływem treningu

wytrzymałościowego [86]. A zatem, w warunkach fizjologicznych liczba kopii mtDNA z reguły odzwierciedla stan energetyczny komórek [87]. Zależność pomiędzy względną liczbą kopii DNA mitochondrialnego a rakiem jest nadal przedmiotem dyskusji, w której różne typy guzów dostarczają różnych wyników [12, 71]. Doniesienia literaturowe wskazują na związek między niską zawartością mtDNA a dynamicznym przebiegiem (w żargonie: „agresywnością”) raka, niemniej dokładne mechanizmy biologiczne pozostają niejasne. Postuluje się, że krytyczna redukcja zawartości mtDNA może upośledzać funkcjonowanie mitochondriów. Późniejsze zmiany w procesach komórkowych, takie jak oddychanie tlenowe, homeostaza wapniowa lub wewnętrzny szlak apoptotyczny, mogą z kolei wpływać na kancerogenezę, w tym progresję nowotworu [19]. Ponadto uważa się, że hipoksyjne mikrośrodowisko może stymulować obniżenie zawartości mtDNA w tkance guza [72], a jak powszechnie wiadomo, rak trzustki jest jednym z najbardziej hiposycyjnych nowotworów. Pomimo tych doniesień, w literaturze przestrzega się przed stawianiem znaku równości pomiędzy względną liczbą kopii DNA mitochondrialnego a aktywnością oddechową tkanek [12]. W kilku badaniach (in vitro i in vivo) wykazano obniżenie względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego bez jednoczesnej redukcji transkrypcji z mtDNA. Jednoczesna analiza względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego i analiza ekspresji mitochondrialnych transkryptów pozwoliłaby przybliżyć się do odpowiedzi na pytanie, jakie są konsekwencje obniżenia liczby kopii DNA mitochondrialnego w tkance nowotworowej.

Według naszej wiedzy opublikowaliśmy pierwszą pracę na temat względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego w tkance resekcyjnych gruczolakoraków trzustki. Do tej pory w literaturze można było znaleźć pracę dotyczącą genomu mitochondrialnego linii komórkowych raka trzustki i ksenograftów [73]. Jones i wsp. z użyciem hybrydyzacji Southerna wyznaczyli względną ilość mtDNA w próbkach pochodzących z dwóch ksenograftów raka trzustki wraz ze sparowanymi fragmentami tkanek zdrowej dwunastnicy. Wyniki tej pracy wskazują na zwiększoną ilość mtDNA w komórkach raka trzustki, co nie koresponduje z naszymi wynikami. Jednakże analiza Jones i wsp. uwzględniała

jedynie dwa zestawy próbek i zestawiała je z fragmentami tkanki jelita. W tym miejscu warto zaznaczyć, że Reznik i wsp. (którzy zanalizowali ponad 1000 par guz-otaczająca tkanka z 15 typów nowotworów) raportowali, że w przypadku guzów z obniżoną względną zawartością mtDNA, zawsze znajdowali przynajmniej jedną parę próbek, gdzie zawartość mtDNA w guzie była wyższa niż w otaczającej tkance [12].

Związek pomiędzy względną liczbą kopii DNA mitochondrialnego a parametrami histopatologicznymi był raportowany w literaturze dla różnych typów nowotworów, ale nie dla gruczolakoraka trzustki. Nasze wyniki wskazują, że w przypadku gruczolakoraka trzustki, względna liczba kopii DNA mitochondrialnego spada wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej (*ang. grading*) [69]. Nasze rezultaty korespondują z wynikami badania Yu i wsp. nad rakiem piersi, w którym także wykazano spadek zawartości mtDNA wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej [31]. Podobnie, Zhang i wsp. raportowali istotną negatywną korelację pomiędzy względną liczbą kopii mtDNA a stopniem złośliwości histologicznej u pacjentów z glejakami mózgu [74]. W kontekście zajęcia węzłów chłonnych, przeprowadzone przez nas badanie nie dowiodło istotnej statystycznie różnicy względnej liczby kopii mitochondrialnego DNA pomiędzy guzami N0 (dla których badanie histopatologiczne nie wykazało przerzutów do węzłów chłonnych) a guzami N1 (przerzutującymi do węzłów chłonnych) [69]. Ten rezultat koresponduje z wynikami badań przeprowadzonych przez Chang i wsp. (rak jelita grubego) [75], Lee i wsp. (rak żołądka) [76], Yu i wsp. (rak piersi) [31]. Przeprowadzone przez nas badanie nie dowiodło istotnej statystycznie różnicy względnej liczby kopii mitochondrialnego DNA pomiędzy guzami R0 (dla których badanie histopatologiczne nie wykazało komórek nowotworowych w marginesie chirurgicznym) a guzami R1 (mikroskopowo widoczne komórki nowotworowe w marginesie chirurgicznym) [69]. Ten rezultat koresponduje z wynikami badań przeprowadzonych przez Chang i wsp. (rak jelita grubego) [75], Yamadę i wsp. (rak wątrobowokomórkowy) [77]. W odniesieniu do lokalizacji guza w obrębie trzustki, w naszym badaniu nie zanotowano istotnej statystycznie różnicy względnej liczby kopii

mitochondrialnego DNA pomiędzy guzami położonymi w głowie trzustki a guzami o innych lokalizacjach [69]. Ten rezultat koresponduje z wynikami badań przeprowadzonych przez Chang i wsp. (rak jelita grubego) [75], Zhanga i wsp. (rak żołądka) [78].

Aby sprawdzić relacje między względną liczbą kopii mtDNA a przebiegiem nowotworu *in vivo*, przeanalizowaliśmy zawartość mtDNA w guzie i rokowanie w jednorodnej grupie 43 pacjentów z przewodowym gruczolakorakiem trzustki. Jest to pierwsza opublikowana praca na temat wartości prognostycznej względnej liczby kopii mtDNA w raku trzustki. Nasze badanie nie dowiodło wartości prognostycznej względnej liczby kopii DNA mitochondrialnego w populacji pacjentów z gruczolakorakiem przewodowym trzustki [69]. Ten rezultat koresponduje z wynikami badań przeprowadzonych przez Yamadę i wsp. (rak wątrobowokomórkowy), Lee i wsp., Mohideen i wsp. (rak jelita grubego) [76-77,79].

Praca zatytułowana „Clinical value of tissue DNA integrity index in pancreatic cancer” jest pierwszą w literaturze pracą na temat indeksu integralności DNA w tkance gruczolakoraka przewodowego trzustki. W pracy wykazano, że próbki pochodzące z guzów, które w badaniu histopatologicznym zostały oznaczone jako R1 (z uwagi na obecność komórek nowotworowych w marginesie chirurgicznym) miały istotnie statystycznie wyższy stosunek *LINE1 300/79* niż próbki pochodzące z kontrolnej otaczającej tkanki trzustkowej, $P < 0.05$ [70]. Analiza krzywej ROC ujawniła, że indeks integralności DNA (DII) wyrażony jako stosunek *LINE1 300/79* jest dobrym parametrem różnicującym guzy R1 od otaczającej tkanki trzustkowej ($P < 0.05$), a także od guzów R0. Badanie nie dowiodło korelacji pomiędzy tkankowym indeksem integralności DNA a stopniem zróżnicowania histopatologicznego, przerzutami do węzłów chłonnych oraz lokalizacją guza w obrębie trzustki [70]. W badaniu nie udało się dowieść wartości prognostycznej indeksu integralności DNA w populacji pacjentów z gruczolakorakiem przewodowym trzustki [70].

Wśród pacjentów poddanych operacji z powodu raka trzustki, status marginesu chirurgicznego

należy do najważniejszych czynników prognostycznych. Niestety, odsetek mikroskopowo dodatnich marginesów chirurgicznych (R1) różni się znacznie między badaniami (od poniżej 20% do ponad 75%). Przyczyn tej rozbieżności upatruje się w niejednorodnej nomenklaturze, niedostatecznej standaryzacji badania histopatologicznego oraz rozbieżności w definicji mikroskopowo dodatniego marginesu chirurgicznego [80]. Nasze wstępne wyniki wykazały, że tkankowy indeks integralności DNA *LINE1 300/79* jest dobrym parametrem do rozróżnienia pomiędzy guzami R0 i R1, a zatem może pomóc w obiektywnej ocenie statusu marginesu chirurgicznego. W literaturze brakuje badań nad parametrami pomocniczymi w obiektywizacji oceny statusu marginesu chirurgicznego dla raka trzustki. Niemniej, w przypadku raka piersi, proponowane są następujące metody [84]: metoda optycznej tomografii koherencyjnej oraz metoda ilościowej spektroskopii rozproszonego odbicia. W zestawieniu z tymi potencjalnymi narzędziami, zaproponowany w pracy indeks integralności DNA wyróżnia się dostępnością metody. Podobną (a nawet większą) dostępnością cechuje się strategia zaproponowana (dla raka piersi) przez Margenthaler i wsp. [85], polegająca na wyliczeniu indeksu marginesu chirurgicznego (indeks marginesu chirurgicznego = najkrótszy margines [mm] / wielkość guza [mm] x 100 %).

Indeks integralności DNA oznaczany z krwi obwodowej jest obiecującym czynnikiem prognostycznym w wielu typach nowotworów [34,46-49], z nielicznymi wyjątkami, wśród których znajduje się rak trzustki [81]. Sikora i wsp. wykazali, że oznaczane z krwi obwodowej poziomy cfDNA i indeksu integralności DNA nie powinny być oznaczane w celach klinicznych u pacjentów z rakiem trzustki. W powyższym badaniu autorzy odnotowali wyjątkowo niskie poziomy cfDNA pochodzenia martwicze w osoczu pacjentów z rakiem trzustki. Z tego powodu oznaczenia DII w tej grupie pacjentów były niemiernodajne [81]. Utomo i wsp. potwierdzili te wyniki raportując brak istotnej różnicy w wartościach DII oznaczanego z krwi obwodowej pomiędzy pacjentami z rakiem trzustki a zdrowymi pacjentami z grupy kontrolnej [82]. Doniesienia z obu powyższych prac mogą być wyjaśnione wynikami Jahr i wsp. [83]. W swoim badaniu autorzy wykazują, że odsetek cfDNA

pochodzącego z komórek nowotworowych wynosi od 10% do 90% całkowitego cfDNA we krwi obwodowej, w zależności od rodzaju nowotworu. Ponadto, w badaniu Utomo i wsp. nie wykazano różnicy w wartościach cfDNA oraz DII oznaczanych z płynu torbieli trzustki o niskim i wysokim ryzyku nowotworzenia [82]. Te doniesienia korespondują z naszymi wynikami. W badaniu, wykazaliśmy istotną statystycznie różnicę w wartości DII pomiędzy kontrolną tkanką trzustkową a guzami oznaczonymi histopatologicznie jako R1. Mikroskopowe naciekanie otaczającego miększu trzustkowego świadczy o bardziej dynamicznym przebiegu tych nowotworów. Można przypuszczać, że komórki raka trzustki *in vivo* zaczynają produkować więcej nekrotycznego DNA jedynie na pewnym etapie swojego rozwoju.

WNIOSKI

1 Względna liczba kopii mitochondrialnego DNA z tkanki gruczolakoraka trzustki jest istotnie statystycznie niższa niż względna liczba kopii mitochondrialnego DNA z otaczającej tkanki trzustkowej ($P < 0.001$).

2 Względna liczba kopii DNA mitochondrialnego zmniejsza się wraz ze zmniejszającym się stopniem zróżnicowania histopatologicznego ($P < 0.001$).

3 Indeks integralności DNA (DII) wyrażony jako stosunek LINE1 300/79 jest dobrym parametrem różnicującym guzy R1 od otaczającej tkanki trzustkowej ($P < 0.05$), a także od guzów R0.

8. Bibliografia.

1. GLOBOCAN 2018 : <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/616-poland-factsheets.pdf>
2. Le N, Sund M, Vinci A; GEMS collaborating group of Pancreas 2000. Prognostic and predictive markers in pancreatic adenocarcinoma. *Dig Liver Dis.* 2016 Mar;48(3):223-30. doi: 10.1016/j.dld.2015.11.001. Epub 2015 Nov 14. Review. PMID: 26769569
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
4. Saung, MT, Zheng L. Current Standards of Chemotherapy for Pancreatic Cancer. *Clin Ther.* 2017 Nov; 39(11): 2125–2134. Published online 2017 Sep 19. doi:10.1016/j.clinthera.2017.08.015. PMID: 28939405
5. Adamska A, Domenichini A, Falasca M: Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *Int J Mol Sci.* 2017 Jun 22;18(7). pii: E1338. doi: 10.3390/ijms18071338. Review. PMID: 28640192
6. Klaiber U, Hackert T. Conversion Surgery for Pancreatic Cancer—The Impact of Neoadjuvant Treatment. *Front Oncol.* 2019; 9: 1501. Published online 2020 Jan 14. doi: 10.3389/fonc.2019.01501. PMID: 31993372
7. Khaled Y. Elbanna, Hyun-Jung Jang, Tae Kyoung Kim. Imaging diagnosis and staging of pancreatic ductal adenocarcinoma: a comprehensive review. *Insights Imaging.* 2020 Dec; 11: 58. Published online 2020 Apr 25. doi: 10.1186/s13244-020-00861-y. PMID: 32335790
8. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol.* 2019 Feb; 10(1): 10–27. Published online 2019

Feb 26. doi: 10.14740/wjon1166. PMCID: PMC6396775. PMID: 30834048

9. Torgeson A, Garrido-Laguna I, Tao R, Cannon GM, Scaife CL, Lloyd S. Value of surgical resection and timing of therapy in patients with pancreatic cancer at high risk for positive margins. *ESMO Open*. 2018 Jan 27;3(1):e000282. doi: 10.1136/esmoopen-2017-000282. ECollection 2018.
10. Tummala P, Howard T, Agarwal B. Dramatic Survival Benefit Related to R0 Resection of Pancreatic Adenocarcinoma in Patients With Tumor ≤ 25 mm in Size and ≤ 1 Involved Lymph Nodes. *Clin Transl Gastroenterol*. 2013 Mar; 4(3): e33. Published online 2013 Mar 21. doi: 10.1038/ctg.2013.4. PMCID: PMC3615697. PMID: 23515131
11. Satoh M, Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* 1991. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90467-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90467-9)
12. Reznik E, Miller ML, Şenbabaoğlu Y, Riaz N, Sarungbam J, Tickoo SK, et al. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife* 2016;5. doi:10.7554/eLife.10769.
13. Lenart J. Mitochondria in brain hypoxia. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2017;71:118–28.
14. Kodroń A, Ghanim M, Krawczyk KK, Stelmaszczyk-Emmel A, Tońska K, Demkow U, et al. Mitochondrial DNA in pediatric leukemia patients. *Acta Biochim Pol* 2017;64:183–7. doi:10.18388/abp.2016_1444.
15. Yacoub HA, Mahmoud WM, El-Din El-Baz HA, Eid OM, ELfayoumi RI, Elhamidy SM, et al. Novel mutations in the displacement loop of mitochondrial DNA are associated with acute lymphoblastic leukemia: A genetic sequencing study. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2014;15:9283–9. doi:10.7314/APJCP.2014.15.21.9283.
16. Hsu C-C, Tseng L-M, Lee H-C. Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression. *Exp Biol Med (Maywood)* 2016;3:1535370216641787. doi:10.1177/1535370216641787.

17. Su X, Wang W, Ruan G, Liang M, Zheng J, Chen Y, et al. A comprehensive characterization of mitochondrial genome in papillary thyroid cancer. *Int J Mol Sci* 2016;17. doi:10.3390/ijms17101594.
18. Lin C-S, Lee H-T, Lee M-H, Pan S-C, Ke C-Y, Chiu A, et al. Role of Mitochondrial DNA Copy Number Alteration in Human Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2016;17:814. doi:10.3390/ijms17060814.
19. Fan AX-C, Radpour R, Haghighi MM, Kohler C, Xia P, Hahn S, et al. Mitochondrial DNA content in paired normal and cancerous breast tissue samples from patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:983–9. doi:10.1007/s00432-008-0533-9.
20. Guha M., Srinivasan S., Ruthel G., Kashina A.K., Carstens R.P., Mendoza A., Khanna C., van Winkle T., Avadhani N.G. Mitochondrial retrograde signaling induces epithelial-mesenchymal transition and generates breast cancer stem cells. *Oncogene*. 2014;33:5238–5250. doi: 10.1038/onc.2013.467.
21. Wen S, Gao J, Zhang L, Zhou H, Fang D, Feng S.: p53 increase mitochondrial copy number via up-regulation of mitochondrial transcription factor A in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 Nov 15;7(46):75981-75995. doi: 10.18632/oncotarget.12514. PMID: 27732955
22. Jiang HL, Sun HF, Gao SP, Li LD, Huang S, Hu X, Liu S, Wu J, Shao ZM, Jin W.: SSBP1 Suppresses TGF β -Driven Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer by Regulating Mitochondrial Retrograde Signaling. *Cancer Res*. 2016 Feb 15;76(4):952-64. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1630. Epub 2015 Dec 16. PMID: 26676758
23. Qu F, Liu X, Zhou F, Yang H, Bao G, He X, et al. Association between mitochondrial DNA content in leukocytes and colorectal cancer risk: a case-control analysis. *Cancer*

2011;117:3148–55. doi:10.1002/cncr.25906.

24. Shen J, Wan J, Song R, Zhao H. Peripheral blood mitochondrial DNA copy number, length heteroplasmy and breast cancer risk: a replication study. *Carcinogenesis* 2015;36:1307–13. doi:10.1093/carcin/bgv130.
25. Zhu X, Mao Y, Huang T, Yan C, Yu F, Du J, et al. High mitochondrial DNA copy number was associated with an increased gastric cancer risk in a Chinese population. *Mol Carcinog* 2017;56:2593–600. doi:10.1002/mc.22703.
26. Shen J, Song R, Lu Z, Zhao H. Mitochondrial DNA copy number in whole blood and glioma risk: A case control study. *Mol Carcinog* 2016;55:2089–94. doi:10.1002/mc.22453.
27. Shen J, Gopalakrishnan V, Lee JE, Fang S, Zhao H. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood and melanoma risk. *PLoS One* 2015;10. doi:10.1371/journal.pone.0131649.
28. Xu E, Sun W, Gu J, Chow WH, Ajani JA, Wu X. Association of mitochondrial DNA copy number in peripheral blood leukocytes with risk of esophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2013;34:2521–4. doi:10.1093/carcin/bgt230.
29. Meng S, De Vivo I, Liang L, Giovannucci E, Tang JY, Han J. Pre-diagnostic leukocyte mitochondrial DNA copy number and skin cancer risk. *Carcinogenesis* 2016;37:897–903. doi:10.1093/carcin/bgw072.
30. Lynch SM, Weinstein SJ, Virtamo J, Lan Q, Liu C-S, Cheng W-L, et al. Mitochondrial DNA Copy Number and Pancreatic Cancer in the Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Cancer Prev Res* 2011;4:1912–9. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0002.
31. Yu M, Zhou Y, Shi Y, Ning L, Yang Y, Wei X, et al. Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in Chinese breast cancer patients.

IUBMB Life 2007;59:450–7. doi:10.1080/15216540701509955.

32. Feng D, Xu H, Li X, Wei Y, Jiang H, Xu H, et al. An association analysis between mitochondrial DNA content, G10398A polymorphism, HPV infection, and the prognosis of cervical cancer in the Chinese Han population. *Tumor Biol* 2016;37:5599–607. doi:10.1007/s13277-015-4429-4.
33. Jiang W-W, Zahurak M, Goldenberg D, Milman Y, Park HL, Westra WH, et al. Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients. *Int J Canc* 2006; 119:2673e6. <https://doi.org/10.1002/ijc.22250>.
34. Chudasama DY, Aladag Z, Felicien MI, Hall M, Beeson J, Asadi N, et al. Prognostic value of the DNA integrity index in patients with malignant lung tumors. *Oncotarget* 2018;9 doi.org/10.18632/oncotarget.25086.
35. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Canc* 2011. <https://doi.org/10.1038/nrc3066>.
36. Yu J, Gu G, Ju S. Recent advances in clinical applications of circulating cell-free DNA integrity. *Lab Med* 2014;45(1):6e11. Winter. doi: 10.1309/lmkkox6ujzqgw0ea.
37. El-Shazly SF, Eid MA, El-Souroy HA, Attia GF, Ezzat SA. Evaluation of serum DNA integrity as a screening and prognostic tool in patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Markers* 2010 Apr-Jun;25(2):79e86.
38. Chen H, Sun LY, Zheng HQ, Zhang QF, Jin XM. Total serum DNA and DNA integrity: diagnostic value in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Pathology* 2012 Jun;44(4):318e24. <https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e328353a24c>.
39. Mead R, Duku M, Bhandari P, Cree IA. Circulating tumour markers can define patients with

normal colons, benign polyps, and cancers. *Br J Canc* 2011 Jul 12;105(2):239e45.

<https://doi.org/10.1038/bjc.2011.230>. Epub 2011 Jun 28.

40. Hanley R1, Rieger-Christ KM, Canes D, Emara NR, Shuber AP, Boynton KA, et al. DNA integrity assay: a plasma-based screening tool for the detection of prostate cancer. *Clin Canc Res* 2006 Aug 1;12(15):4569e74. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0130.
41. Gao YJ, He YJ, Yang ZL, Shao HY, Zuo Y, Bai Y, et al. Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia. *Clin Chem Lab Med* 2010 Nov;48(11):1651e6. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.311>. Epub 2010 Sep. 13.10.
42. Sunami E, Vu AT, Nguyen SL, Giuliano AE, Hoon DS. Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2008 Aug;1137:171e4. <https://doi.org/10.1196/annals.1448.011.11>.
43. Pinzani P, Salvianti F, Zaccara S, Massi D, De Giorgi V, Pazzagli M, et al. Circulating cell-free DNA in plasma of melanoma patients: qualitative and quantitative considerations. *Clin Chim Acta* 2011 Nov 20;412(23e24):2141e5. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.07.027>. Epub 2011 Aug 3.12.
44. Agostini M, Pucciarelli S, Enzo MV, Del Bianco P, Briarava M, Bedin C, et al. Circulating cell-free DNA: a promising marker of pathologic tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2011 Sep;18(9):2461e8. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-1638-y>. Epub 2011 Mar 17.13.
45. Chan KC, Leung SF, Yeung SW, Chan AT, Lo YM. Persistent aberrations in circulating DNA integrity after radiotherapy are associated with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clin Canc Res* 2008 Jul 1;14(13):4141e5. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0182.14>.

46. Li M, Jia Y, Xu J, Cheng X, Xu C. Assessment of the circulating cell-free DNA marker association with diagnosis and prognostic prediction in patients with lymphoma: a single-center experience. *Ann Hematol* 2017;96:1343e51. <https://doi.org/10.1007/s00277-017-3043-5>.15.
47. El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, Bascoul-Mollevi C, Gillet B, Nouaille M, et al. Circulating DNA as a strong multimarker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. *Clin Canc Res* 2016. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0297>.16.
48. Cheng J, Holland-Letz T, Wallwiener M, Surowy H, Cuk K, Schott S, et al. Circulating free DNA integrity and concentration as independent prognostic markers in metastatic breast cancer. *Breast Canc Res Treat* 2018. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4666-5>.17.
49. Iqbal S, Vishnubhatla S, Raina V, Sharma S, Gogia A, Deo SSV, et al. Circulating cell-free DNA and its integrity as a prognostic marker for breast cancer. *SpringerPlus* 2015;4. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1071-y>.18.
50. Akca H, Demiray A, Yaren A, Bir F, Koseler A, Iwakawa R, et al. Utility of serum DNA and pyrosequencing for the detection of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Canc Genet* 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2013.01.005>.19.
51. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001. <https://doi.org/10.1038/35057062>.20.
52. Deininger P. Alu elements: know the SINEs. *Genome Biol* 2011 Dec 28;12(12):236. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-12-236>
53. Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet* 2003. doi:10.1038/ng1223.

54. Tangkijvanich P, Hourpai N, Rattanatanyong P, Wisedopas N, Mahachai V, Mutirangura A. Serum LINE-1 hypomethylation as a potential prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 2007. doi:10.1016/j.cca.2006.12.029.
55. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: Direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem* 2006. doi:10.1373/clinchem.2006.068577.
56. Cheng J, Cuk K, Heil J, Golatta M, Schott S, Sohn C, et al. Cell-free circulating DNA integrity is an independent predictor of impending breast cancer recurrence. *Oncotarget* 2017. doi:10.18632/oncotarget.17384.
57. Xu J, Huang L, Li J.: DNA aneuploidy and breast cancer: a meta-analysis of 141,163 cases. *Oncotarget*. 2016 Aug 9. doi: 10.18632/oncotarget.11130.
58. Yasunaga J, Jeang KT. Viral transformation and aneuploidy. *Environ Mol Mutagen*. 2009 Oct;50(8):733-40. doi: 10.1002/em.20480. PMID: 19326462
59. Mauland KK, Wik E, Salvesen HB: Clinical value of DNA content assessment in endometrial cancer. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014 May;86(3):154-63. doi: 10.1002/cyto.b.21164. Epub 2014 Feb 14. Review.
60. Xynos ID, Kavantzias N, Tsaousi S et.al.: Factors Influencing Survival in Stage IV Colorectal Cancer: The Influence of DNA Ploidy. *ISRN Gastroenterol*. 2013 Jun 4;2013:490578. doi: 10.1155/2013/490578. Print 2013.
61. Bansal A, Gupta A, Saxena S.: Correlation of p53 immunoexpression with DNA ploidy and apoptotic index in subsets of prostate cancer: A marker reiterated in progression and recurrence of prostate cancer. *South Asian J Cancer*. 2015 Apr-Jun;4(2):88-90. doi: 10.4103/2278-330X.155693.

62. Syrios J, Sougioultzis S, Xynos ID et al.: Survival in patients with stage IV noncardia gastric cancer - the influence of DNA ploidy and Helicobacter pylori infection. *BMC Cancer*. 2012 Jun 21;12:264. doi: 10.1186/1471-2407-12-264.
63. Feng YC, Yang J, Liu CM et al.: DNA ploidy of cervical epithelial cells should be a cure criterion of high-risk HPV infection in Xinjiang Uygur women. *Onco Targets Ther*. 2015 Apr 13;8:827-33. doi: 10.2147/OTT.S80769. eCollection 2015.
64. Kamphues C, Al-Abadi H, Dürr A et al.: DNA index as a strong prognostic factor in patients with adenocarcinoma of the pancreatic head: results of a 5-year prospective study. *Pancreas*. 2013 Jul;42(5):807-12. doi: 10.1097/MPA.0b013e3182773eb6.
65. Berczi C, Bocsi J, Lapis K et al.: Relationship between the survival and the clinicopathological parameters of the patients with tumors in the pancreatic head region. *Acta Chir Hung*. 1999;38(3-4):235-41.
66. Klein F, Bahra M, Schirmeier A et al.: Prognostic significance of DNA cytometry for adjuvant therapy response in pancreatic cancer. *J Surg Oncol*. 2015 Jul;112(1):66-71. doi: 10.1002/jso.23951.
67. Allison DC, Piantadosi S, Hruban RH et al.: DNA content and other factors associated with ten-year survival after resection of pancreatic carcinoma. *J Surg Oncol*. 1998 Mar;67(3):151-9.
68. Durlík M, Tuchalska-Czuroń J. Ploidy and DNA index as prognostic factors in resected pancreatic ductal adenocarcinoma - a review of the literature. *Prz Gastroenterol*. 2014;9(6):313-6. doi: 10.5114/pg.2014.47892. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25653724
69. Tuchalska-Czuroń J, Lenart J, Augustyniak J, Durlík M. Is mitochondrial DNA copy number a good prognostic marker in resectable pancreatic cancer? *Pancreatology*. 2019 Jan;19(1): 73-

79. doi: 10.1016/j.pan.2018.11.009. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30528645
70. Tuchalska-Czuroń J, Lenart J, Augustyniak J, Durlik M. Clinical value of tissue DNA integrity index in pancreatic cancer. *Surgeon*. 2020. DOI: 10.1016/j.surge.2019.10.008 PMID: 32156475
71. Chen N, Wen S, Sun X, Fang Q, Huang L, Liu S, et al. Elevated mitochondrial DNA copy number in peripheral blood and tissue predict the opposite outcome of cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* 2016. <https://doi.org/10.1038/srep37404>.
72. Bai R-K, Chang J, Yeh K-T, Lou MA, Lu J-F, Tan D-J, et al. Mitochondrial DNA content varies with pathological characteristics of breast cancer. *J Oncol* 2011;2011:1e10. <https://doi.org/10.1155/2011/496189>.
73. Jones JB, Song JJ, Hempen PM, Parmigiani G, Hruban RH, Kern SE. Detection of mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer offers a massive advantage over detection of nuclear DNA mutations. *Cancer Res* 2001;61:1299e304.
74. Zhang Y, Qu Y, Gao K, Yang Q, Shi B, Hou P, et al. High copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) predicts good prognosis in glioma patients. *Am J Cancer Res* 2015 Feb 15;5(3):1207e16. eCollection 2015.
75. Chang SC, Lin PC, Yang SH, Wang HS, Liang WY, Lin JK. Mitochondrial D-loop mutation is a common event in colorectal cancers with p53 mutations. *Int J Colorectal Dis* 2009. <https://doi.org/10.1007/s00384-009-0663-9>.
76. Lee H, Lee JH, Kim DC, Hwang IS, Kang YN, Gwon GJ, et al. Is mitochondrial DNA copy number associated with clinical characteristics and prognosis in gastric cancer? *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2015. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.1.87>.

77. Yamada S, Nomoto S, Fujii T, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, et al. Correlation between copy number of mitochondrial DNA and clinico-pathologic parameters of hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2006.01.002>
78. Zhang G, Qu Y, Dang S, Yang Q, Shi B, Hou P. Variable copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) predicts worse prognosis in advanced gastric cancer patients. *Diagn Pathol* 2013. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-8-173>.
79. Mohideen AM, SH, Dicks E, Parfrey P, Green R, Savas S. Mitochondrial DNA polymorphisms, its copy number change and outcome in colorectal cancer. *BMC Res Notes* 2015. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1250-5>
80. Verbeke CS, Menon KV. Redefining resection margin status in pancreatic cancer. *HPB* 2009 Jun;11(4):282e9. <https://doi.org/10.1111/j.1477-2574.2009.00055.x.40>.
81. Sikora K, Bedin C, Vicentini C, Malpeli G, D'Angelo E, Sperandio N, et al. Evaluation of cell-free DNA as a biomarker for pancreatic malignancies. *Int J Biol Markers* 2015;30:e136e41. <https://doi.org/10.5301/jbm.5000088>.
82. Utomo WK, Janmaat VT, Verhaar AP, Cros J, Levy P, Ruszniewski P, et al. DNA integrity as biomarker in pancreatic cyst fluid. *Am J Cancer Res* 2016;6(8):1837e41. Published online 2016 Aug 1. PMID: PMC5004084.
83. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Canc Res* 2001 Feb 15;61(4):1659e65.
84. Emmadi R, Wiley EL. Evaluation of resection margins in breast conservation therapy: the pathology perspective-past, present, and future. *Int J Surg Oncol*. 2012;2012:180259. doi:10.1155/2012/180259

85. Margenthaler JA, Gao F, Klimberg VS. Margin index: a new method for prediction of residual disease after breast-conserving surgery. *Annals of Surgical Oncology*. 2010;17(10):2696–2701.
86. Holloszy JO. Regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 expression by exercise. *Compr Physiol*. 2011 Apr;1(2):921-40. doi: 10.1002/cphy.c100052. PMID: 23737207.
87. Castellani CA, Longchamps RJ, Sun J, Guallar E, Arking DE. Thinking outside the nucleus: Mitochondrial DNA copy number in health and disease. *Mitochondrion*. 2020 Jul;53:214-223. doi: 10.1016/j.mito.2020.06.004. Epub 2020 Jun 13. PMID: 32544465; PMCID: PMC7375936.

9. Kopie publikacji wchodzących w skład zbioru.

W załącznikach.

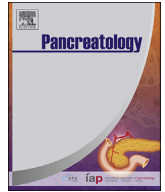
10. Pisemne oświadczenia autorów prac tworzących zbiór.

10.1 Oświadczenia kandydata określające jego indywidualny wkład w powstanie każdej z prac tworzących zbiór.

W załącznikach.

10.2 Oświadczenia pozostałych współautorów prac tworzących zbiór.

W załącznikach.



Is mitochondrial DNA copy number a good prognostic marker in resectable pancreatic cancer?

Julia Tuchalska-Czuroń ^{a,d,*}, Jacek Lenart ^b, Justyna Augustyniak ^c, Marek Durlik ^{a,e}

^a Department of Surgical Research and Transplantology, Medical Research Centre Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

^b Department of Neurochemistry, Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

^c Stem Cell Bioengineering Unit, Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

^d Diagnostic Radiology Department, Central Clinical Hospital of the MSWiA in Warsaw, Poland

^e Clinical Department of Gastroenterological Surgery and Transplantation, Central Clinical Hospital of the MSWiA in Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2018

Received in revised form

28 October 2018

Accepted 21 November 2018

Available online 22 November 2018

Keywords:

mtDNA copy number

Pancreatic cancer

Prognostic marker

Mitochondrial DNA

Survival

ABSTRACT

Background: The aim of this prospective study was to investigate mitochondrial DNA (mtDNA) copy number in a group of resectable pancreatic cancer (PC) tumor tissues and adjacent normal pancreatic tissues, and to explore the correlation between the mtDNA content in tissues and the clinicopathological parameters and the overall survival.

Methods: Relative mtDNA copy number was measured by the quantitative PCR-based assay. The tumors specimens (n = 43) originated from the patients with pathologically confirmed pancreatic ductal adenocarcinoma who did not receive any neoadjuvant systemic therapy. The adjacent normal pancreatic tissue samples (n = 31) were obtained from surgical margins.

Results: mtDNA copy number was significantly lower in PC tissue (P < 0.001) compared to adjacent normal pancreatic tissue. Jonckheere-Terpstra trend testing indicated a statistically significant decrease in median mtDNA copy number across the differentiation (adjacent normal pancreatic tissue, low-grade, intermediate-grade, high-grade cancer), P < 0.001. However, the survival analyses failed to show a significant difference in survival between patients with high and low mtDNA copy number.

Conclusions: To the best of our knowledge, we provided the first evidence that mitochondrial DNA copy number was significantly lower in pancreatic cancer tissue (P < 0.001) compared to adjacent normal pancreatic tissue. Also, we demonstrated that mitochondrial copy number was not a significant marker for predicting prognosis in resectable pancreatic cancer.

© 2018 IAP and EPC. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: AUC, area under the curve; EMT, epithelial-mesenchymal transition; G1, well-differentiated cancer (low grade); G2, moderately differentiated cancer (intermediate grade); G3, poorly differentiated (high grade); IQR, interquartile range; mtCN, mitochondrial DNA copy number; mtDNA, mitochondrial DNA; nDNA, nuclear DNA; N0, no regional lymph node metastasis; N1, regional lymph node metastasis; Nx, undetermined lymph node involvement; PC, pancreatic cancer; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; R0, tumor pathologically marked as R0, no cancer cells seen microscopically at the resection margin; R1, tumor pathologically marked as R1, cancer cells present microscopically at the resection margin; ROC, receiver operating characteristic; T2, tumor limited to the pancreas, with more than 2 cm in greatest dimension; T3, tumor that extend beyond the pancreas but without involvement of the celiac axis or the superior mesenteric artery; T4, tumor that involve the celiac axis or the superior mesenteric artery.

* Corresponding author. Department of Surgical Research and Transplantology, Mossakowski Medical Research Centre Polish Academy of Sciences, Pawinskiego 5, 02-106, Warsaw, Poland.

E-mail address: jczuron@imdik.pan.pl (J. Tuchalska-Czuroń).

<https://doi.org/10.1016/j.pan.2018.11.009>

1424-3903/© 2018 IAP and EPC. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

A mitochondrion is a semi-autonomous, self-reproducing organelle in the cytoplasm of eukaryotic cells. The copy numbers of mitochondrial DNA (mtDNA) per mitochondrion range from 1 to 15 and the average is almost 5. Each human cell contains approximately 100 mitochondria, giving a total number of mtDNA molecules per human cell of approximately 500 [1]. In comparison to nuclear genomic DNA, mtDNA reveals high mutation rates caused by constant exposure to mutagenic oxygen radicals and lack of the protective mechanisms of DNA repair. These characteristics of mtDNA suggest their potential importance in the pathophysiology of diverse medical conditions [2,3]. Several types of mtDNA alterations have been identified in human cancers. Among them, point mutations and copy number alterations are the two most common mtDNA alterations in cancers. Qualitative aberrations of mtDNA,

such as mutations, have been found in hematological malignancies [4,5] and in solid tumors, such as hepatocellular carcinoma, breast, gastric, prostate and colorectal cancer [6]. Quantitative aberrations of mtDNA have also been observed in various tumors [2]. While increased mtDNA content has been found in lung adenocarcinoma and papillary thyroid cancer [2,7], reduced mtDNA content in bladder, breast, esophageal, renal and liver cancers has been reported [2,8,9]. Because of these aberrations involved in the carcinogenesis, mtDNA may have promising clinical applications for cancers, especially as a biomarker and prognostic factor. In the literature, there are studies investigated mtDNA copy number in peripheral blood leukocytes or in the tumor tissue. Regarding cancer biomarker, increased peripheral blood mtDNA copy number levels were associated with increased risk of renal cell carcinoma, breast, gastric and colorectal cancer, melanoma, and gliomas [10–14]. Low peripheral blood mtDNA copy number levels were associated with increased risk of esophageal adenocarcinoma, bladder cancer and non-melanoma skin cancers [15,16]. Peripheral blood mtDNA copy number has also been investigated in pancreatic cancer patients [17]. In that study higher mtDNA copy number was significantly associated with increased pancreatic cancer risk. Regarding the prognostic factor, low mitochondrial DNA copy number in tumor tissue was correlated with poorer prognosis in breast cancer patients [18]. Similarly, increased tumor mtDNA copy number levels were associated with better survival in adrenocortical carcinoma, chromophobe renal cell carcinoma and low-grade glioma [2]. The opposite trend, of poor survival in patients with high tumor mtDNA, was reported in clear-cell renal cell carcinoma, cervical cancer and melanoma [2,19].

In the present study, we developed a simple and accurate multiplex real-time PCR method for synchronized quantification of nuclear DNA (nDNA) and mtDNA in adjacent normal and cancerous pancreatic tissue samples from patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. To our knowledge, this is the first qPCR-based study to investigate the mitochondrial DNA copy number (mtCN) in pancreatic cancer (PC) tissue, the correlation between mtCN and the pathological parameters and the overall survival.

Materials and methods

Study population and data collection

Samples and matched clinical information were obtained from the Clinical Department of Gastroenterological Surgery and Transplantation Central Clinical Hospital of the Ministry of the Interior and Administration in Warsaw, Poland. Fresh frozen samples of 43 cases of pancreatic ductal adenocarcinoma and 31 cases of adjacent normal pancreatic tissue that were diagnosed and treated from December 2013 to June 2016 were prospectively retrieved. All operations in patients included in the study were performed due to a pancreatic tumor diagnosed in imaging studies. The histological type, stage, and grade of the tumors were classified according to WHO criteria. In the cancer group, all patients have resectable tumors that were pathologically confirmed as pancreatic ductal adenocarcinoma. Further, all PC patients did not receive any neoadjuvant systemic therapy and were treated with gemcitabine after the operation. Among the non-cancer group, the adjacent normal pancreatic tissue samples were obtained from the surgical margin. Within the study population, there were 7 paired samples of tumor and adjacent normal pancreatic tissue. The study was approved by the Medical Ethics Committee of the Central Clinical Hospital of the Ministry of the Interior and Administration in Warsaw, Poland and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. The patients gave their informed consent prior to

their inclusion in the study. Outcome status and dates of recurrence, metastasis or death were obtained from the clinical and hospital records and by patient/family contact until January 2017.

DNA isolation

Total genomic DNA was isolated from pancreatic cancer tissue and adjacent normal tissue with Genomic Mini kit (A&A Biotechnology). DNA purification was performed according to the manufacturer's instructions. The concentration of extracted DNA was obtained by measuring the absorbance at 260 nm using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Until DNA isolation tissues were stored at -80°C . After isolation DNA was stored at -20°C .

Measurements of mtDNA copy number

The relative mtDNA copy number in the 1) tumor tissue and 2) adjacent normal tissue was measured by a quantitative PCR-based method (qPCR) as previously described [17,20,21]. For qPCR analysis primers were designed in Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). PCR efficiency was obtained from the standard curve. PCR efficiency E(%) was in the range 1,92–2,15. We used two pairs of primers in order to perform the relative quantification of mtDNA copy number: *ND1*: fw_TACGGGCTACTACAACCTTC, rv_ATGGTAGATGTGGCGGTTT, was used to amplify *ND1* (Mitochondrially Encoded NADH: Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 1) representing mitochondrial genome, and *SLCO2B1*: fw_CCTGATGCCTAGGTTTCTTTCTTG, rv_GGTCATCTGCCTACCTA-GAAC (Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 2B1) representing nuclear genome. Genes representing mitochondrial (*ND1*) and nuclear (*SLCO2B1*) genome were chosen randomly [22,23]. For qPCR, 10ng of DNA were loaded with 0,25 μM of forward and reverse primers, 12,5 μl of iTaq™ universal SYBR® Green Supermix (Bio-rad) onto 96-well plate for LightCycler® 96 (Roche Diagnostics GmbH). The qPCR was carried out onto 96-well plate for LightCycler® 96 (Roche Diagnostics GmbH) at the PCR reaction conditions: hot start at 95°C for 3 min followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s. The ratio of mitochondrial DNA to nuclear DNA was calculated [24,25] on the basis of the quantification cycle (Cq) values and the baseline settings automatically calculated by the qPCR instrument software. Data were analyzed in the GenEX software (Multid Analyses AB, Göteborg, Sweden).

Statistical analysis

Each sample from each patient was running in the 4 replicates. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc. La Jolla, USA) and PQStat 1.6.6 (PQStat Software, Poland). The Shapiro–Wilk test was used as a test of normality. The student t-test and Fisher's exact test were used to compare cancer and control group regarding age and sex, respectively. Mann Whitney tests, (***) $P < 0.001$, were used to assess the differences between relative mtCN in 1) pancreatic cancer tissue and adjacent normal tissue; 2) tissues from tumors localized in the head of the pancreas and from tumors in other localization; 3) tissues from tumors with negative lymph node status (N0) and from tumors with positive lymph node status (N1). Kruskal-Wallis tests were used to assess the differences between relative mtCN in 1) adjacent normal tissue and tissues from well-differentiated tumors (G1), moderately differentiated tumors (G2) and from poorly differentiated tumors (G3); 2) adjacent normal tissue and tissues from tumors with positive (R1) and negative (R0) surgical margin. Dunn's Multiple Comparison test (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ was used

as a post test. The results shown on the charts were presented as a median with (\pm IQR). A ROC analysis was performed to determine an optimal threshold of mtDNA copy number for pancreatic cancer. Based on a ROC-generated mtCN cut-off point, cancer patients were ranked with either a high or low mtCN status. Subsequently, we have carried out a survival analysis with Kaplan-Meier method, the results were compared with the logrank (Mantel-Cox) Test. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Results were obtained from 74 samples (43 from a pancreatic cancer tissue, 31 from adjacent normal tissue). The mean age was 64.10 (ranging from 37 to 84) for the normal pancreatic tissue group and 63.44 (ranging from 40 to 84) for the cancer group. Within the cancer group, there were 44.19% females and 55.81% males, and within the control group, there were 48.39% females and 51.61% males. Table 1 summarises these basic characteristics of the study population. There were no significant differences between the two groups regarding age, ethnicity, and sex. Within the cancer group, available baseline characteristics included tumor size, lymph node involvement, differentiation grade, sublocation, and surgical margin status; these data are listed in Table 2.

Determination of relative mtDNA copy number *ND1/SCLO2B1* ratio in the pancreatic cancer tissue and adjacent pancreatic tissue.

The median mtDNA copy number (mtCN) and interquartile ranges (IQR) in the 43 pancreatic cancer specimens and in the 31 adjacent normal pancreatic tissue specimens were respectively 123 (IQR 75) and 195 (IQR 462). mtCN was significantly lower in pancreatic cancer tissue ($P < 0.001$) compared to adjacent normal pancreatic tissue. Data were shown in Fig. 1 A. Within the cancer group, most tumors have the relative mtCN ranging from 50 to 200. Data were shown in Fig. 1 B. Within the study population, there were 7 paired samples of tumor and adjacent normal pancreatic tissue. Similarly, in this subgroup, mtCN was lower in pancreatic cancer tissue compared to adjacent normal pancreatic tissue ($P > 0.05$). Data were shown in Figure 4 in the Supplement 1.

Determination of relation between relative mtDNA copy number and the clinicopathological characteristics of pancreatic cancer group.

mtDNA copy number (mtCN) was significantly lower in pancreatic cancer tissue ($P < 0.001$) compared to adjacent normal pancreatic tissue. Furthermore, we observed that mtCN decreased as the PC grading increased. Jonckheere-Terpstra trend testing indicated a statistically significant decrease in median mtCN across the differentiation (adjacent normal pancreatic tissue, low grade, intermediate grade, high grade), $P < 0.001$. Farther, G2 tumors had a significantly lower mtCN than control adjacent normal pancreatic tissue, $P < 0.01$. Data were shown in Fig. 2 A. Regarding lymph node involvement, there was no significant difference in mtCN between specimens from tumors pathologically marked as N1 (tumors with

Table 1

Distribution of selected characteristics of pancreatic cancer cases and controls. For categorical variables, Fisher's exact test was used to examine the differences. For continuous variables, Student's t-test was used to examine the differences. ns – $P > 0.05$.

Characteristics	Cancer group (n = 43) N (%)	Controls (n = 31) N (%)	P-value
Ethnicity			
White	43 (100.0)	31 (100.0)	ns
Sex			
Male	24 (55.81)	16 (51.61)	
Female	19 (44.19)	15 (48.39)	ns
Age (mean; years)	63.44	64.10	ns

Table 2

Baseline characteristics of cancer group included pancreatic cancer staging (the extent of the tumor and lymph node involvement according to TNM classification: T2 refers to the tumors limited to the pancreas, with more than 2 cm in greatest dimension; T3 refers to the tumors that extend beyond the pancreas but without involvement of the celiac axis or the superior mesenteric artery; T4 refers to the tumors that involve the celiac axis or the superior mesenteric artery – borderline tumors; the N0 refers to the specimens from the pancreatic cancers without regional lymph node metastases, while N1 refers to the specimens from pancreatic cancers which have spread to nearby lymph nodes), differentiation grade, sublocation of the tumor and surgical margin status (the R0 corresponds to the specimens from the pancreatic cancers tumors that were pathologically marked as R0 (no cancer cells seen microscopically at the resection margin), while R1 corresponds to the specimens from the pancreatic cancers tumors that were pathologically marked as R1 (cancer cells present microscopically at the resection margin)).

Characteristics	Cancer group (n = 43) N (%)
The extent of the primary tumor	
T2	2 (4.65)
T3	38 (88.37)
T4 (borderline)	3 (6.98)
Lymph node involvement	
N0	5 (11.63)
N1	37 (86.05)
Nx	1 (2.33)
Differentiation grade	
Poor	4 (9.30)
Moderate	29 (67.44)
Well	9 (20.93)
Undetermined	1 (2.33)
Sublocation	
Head	36 (83.72)
Head and body	3 (6.98)
Body and tail	2 (4.65)
Other	2 (4.65)
Surgical margin status	
R0	15 (34.88)
R1	27 (62.79)
Undetermined	1 (2.33)

regional lymph node metastasis) and specimens from tumors marked as N0 (no regional lymph node metastasis). Data were shown in Fig. 2B. Concerning relation between relative mtDNA copy number and a resection margin, both specimens from tumors marked as R0 (no cancer cells seen microscopically at the resection margin) and from tumors marked as R1 (cancer cells present microscopically at the tumor resection margin) had statistically significantly less mtCN compared to surrounding tissue, which is not surprising due to the fact that the samples from all tumors had statistically significantly less mtCN compared to the surrounding tissue. Our results showed no significant differences in the mtCN values for tumors marked as R0 and tumors marked as R1. Data were shown in Fig. 2C. With regard to the PC localization, there were no differences in relative mtCN between tumors localized in the head of the pancreas and tumors in other localization. Data were shown in Fig. 2D.

The impact of relative mtDNA copy number on the overall survival of the patients with resectable pancreatic cancer.

We then evaluated the overall survival of the patients with resectable pancreatic cancer to assess the prognostic value of mtCN. A receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed to determine an optimal threshold of mtDNA copy number for cancer. The area under the ROC curve (AUC) of mtCN for cancer was 0.742. The cut-off point for mtCN for cancer was 231, with a sensitivity of 90.7% and a specificity of 46.9%. Data were shown in Fig. 3A. Based on a ROC-generated mtCN cut-off point (231), cancer patients were ranked with either a high (>231) or low (≤ 231) mtCN

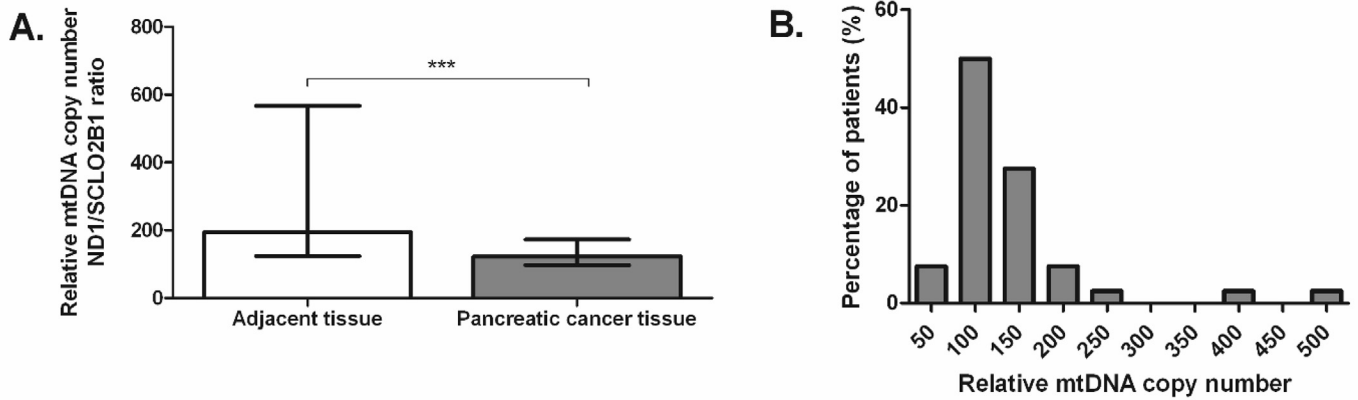


Fig. 1. (A) Relative mtDNA copy number in the adjacent normal pancreatic tissue and pancreatic cancer tissue. Relative mtDNA copy number was measured as a *ND1/SCL02B1* ratio, with qPCR methods. Genes represent mitochondrial (*ND1*) and nuclear (*SCL02B1*) genome were chosen randomly. The graph shows the statistically significant difference between adjacent pancreatic tissue vs. pancreatic cancer tissue (Mann Whitney test). Results shown in the graphs were obtained as a median (\pm IQR), (***) $P < 0.001$. (B) The frequency of relative mtDNA copy number (*ND1/SCL02B1*) in pancreatic tumor tissue.

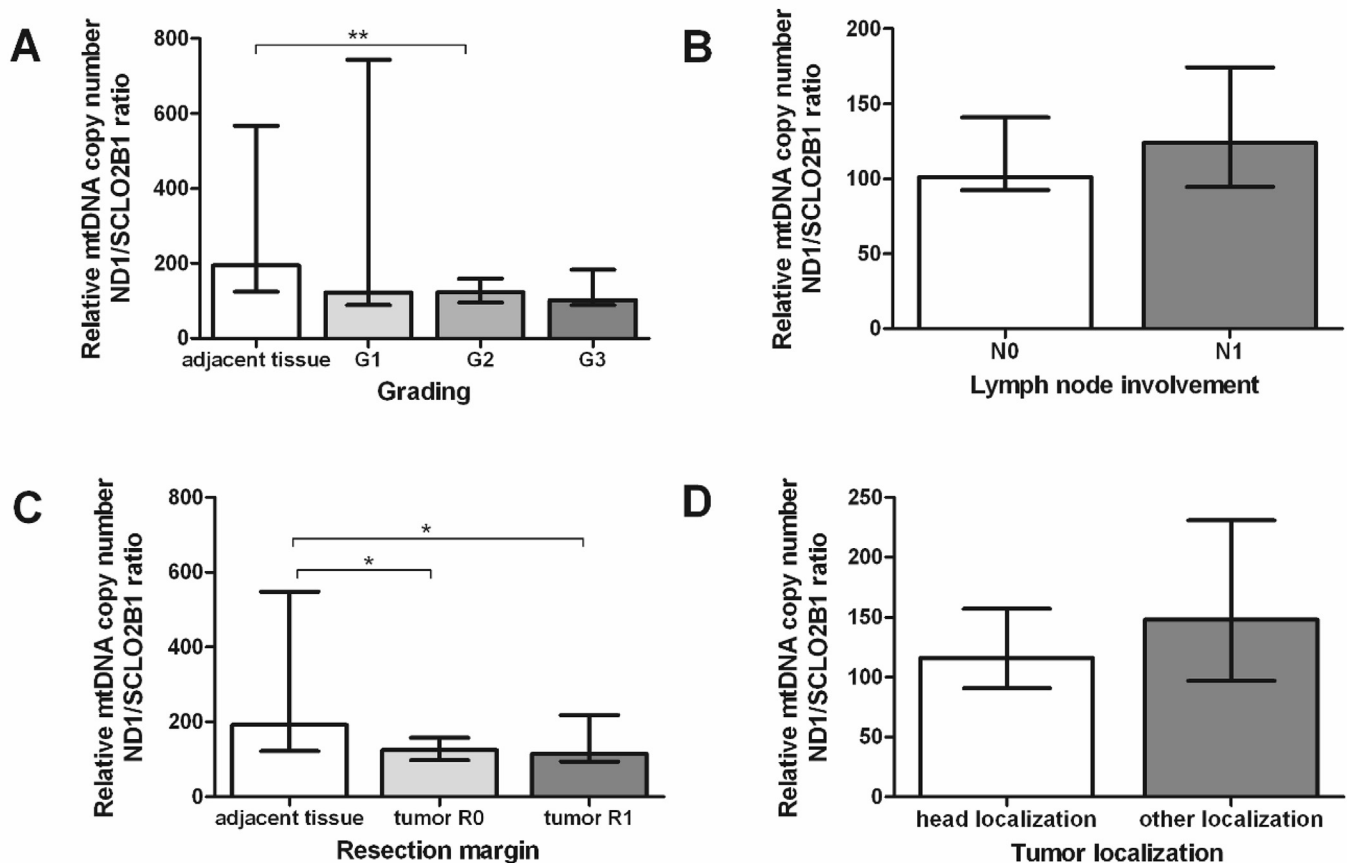


Fig. 2. (A) Relative mtDNA copy number measured as a *ND1/SCL02B1* ratio in the adjacent normal pancreatic tissue and in pancreatic ductal adenocarcinoma pathologically marked as G1, G2 and G3 according to the tumor differentiation. The G1 refers to well-differentiated cancer (low grade); G2 - moderately differentiated cancer (intermediate grade); G3 - poorly differentiated (high grade). The graph shows the statistical significant difference between adjacent tissue and G2 tumors (Kruskal-Wallis test, post test Dunn's Multiple Comparison Test), (**), $P < 0.01$. Results shown in the graphs were obtained as a median (\pm IQR). (B) The impact of the relative mtDNA copy number on the lymph node involvement. The graph shows the non-significant difference between N0 and N1 cancers obtained with Mann Whitney test, $P > 0.05$. The N0 refers to the specimens from the pancreatic cancers without regional lymph node metastases, while N1 refers to the specimens from pancreatic cancers which have spread to nearby lymph nodes. Results shown in the graphs were obtained as a median (\pm IQR). (C) Relative mtDNA copy number level in the adjacent normal pancreatic tissue and in the tumors that were pathologically marked as R0 and R1 according to the resection margin status (Kruskal-Wallis test, post test Dunn's Multiple Comparison Test) *, $P < 0.05$. The graph shows the statistical significant difference between the adjacent tissue vs. tumor R0 and between adjacent tissue vs. tumor R1. The R0 corresponds to the specimens from the pancreatic cancers tumors that were pathologically marked as R0 (no cancer cells seen microscopically at the resection margin), while R1 corresponds to the specimens from the pancreatic cancers tumors that were pathologically marked as R1 (cancer cells present microscopically at the resection margin). Results shown in the graphs were obtained as a median (\pm IQR). (D) The impact of pancreatic cancer tumor localization on the relative mtDNA copy number. The graph shows no difference in mtCN between the tumors localized in the head of the pancreas vs. tumors with other localizations. Results were obtained with Mann Whitney test, $P > 0.05$. Other localizations refer to: the tumors in the body of the pancreas, in the tail of the pancreas and diffuse tumors.

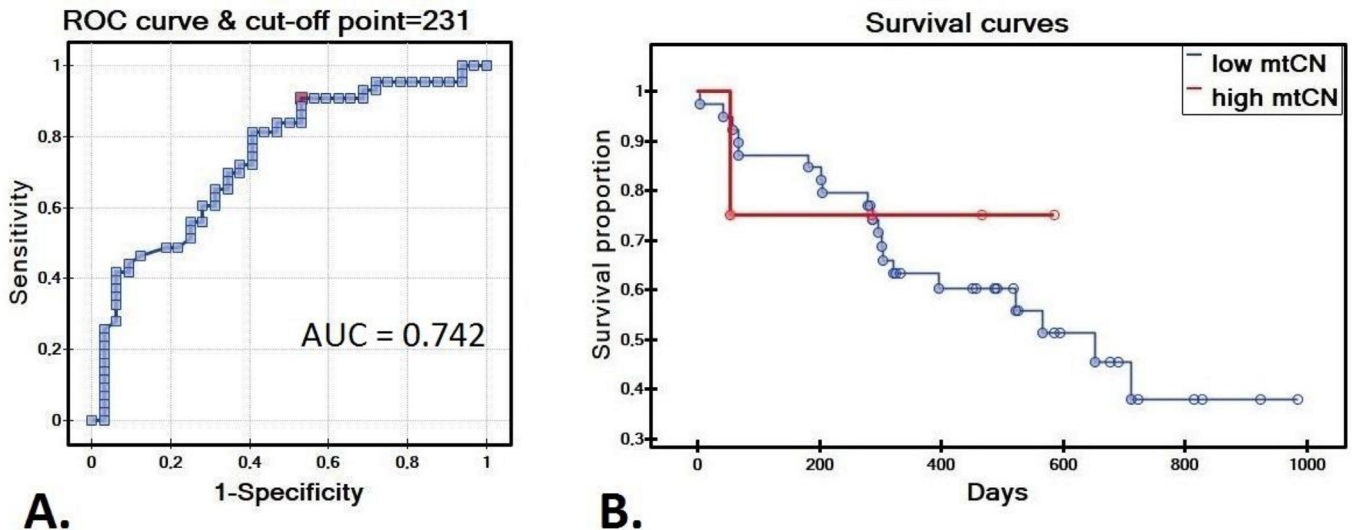


Fig. 3. (A) Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to determine an optimal threshold of mtDNA copy number for pancreatic cancer. A P value < 0.05 was considered statistically significant. AUC – area under the curve. (B) Relative mtDNA copy number measured as *ND1/SCLO2B1* ratio and survival. Kaplan–Meier curves present the overall survival of patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma with higher (red curve) and lower (blue curve) tumor tissue mtDNA copy number, until 2.7 years of follow-up. Results were compared with the logrank (Mantel-Cox) Test. There were no significant differences in survival between the patients with higher and lower mtDNA copy number ($P > 0.05$).

status. Then we have carried out a survival analysis with the Kaplan–Meier method and compared the results with the logrank (Mantel-Cox) test. Obtained results failed to prove that mitochondrial DNA copy number is a good prognostic marker in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. Data were shown in Fig. 3B.

Discussion

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common type of pancreatic cancer with a dismal overall prognosis mainly unchanged over the past decades. Most patients have an unresectable disease with distant metastases at the time of diagnosis. The mean survival in this group is 3–6 months. Only a small number of patients (between 15 and 20%) can be treated completely, which includes radical surgery. The mean survival in this group is 11–24 months. What is more, pancreatic cancer incidence rates continue to rise. Therefore, it is crucial to know the factors affecting the prognosis for the patients to facilitate decision-making on potential individual therapy strategies [26–28].

The association between mtDNA copy number variation and cancer is still subject of debate, with different tumors yielding different results [2,29]. Here we report a comprehensive evaluation of the mitochondrial DNA copy number in pancreatic ductal adenocarcinoma tissue and adjacent normal pancreatic tissue and demonstrate decreased mtDNA content in PC tumor tissue compared to adjacent normal pancreatic tissue. A critical reduction in mtDNA content may compromise mitochondrial functioning with downstream effects. Subsequent changes in cellular processes such as aerobic respiration, calcium homeostasis or the intrinsic apoptotic pathway could, in turn, impact tumorigenic properties. Previous findings have pointed towards a link between low mtDNA content and cancer aggressiveness but the exact association remains uncertain [9]. Pancreatic cancer is known for its extremely aggressive biology and hypoxic microenvironment [30]. It is plausible that a hypoxic environment can reduce tumor mtDNA content as suggested previously [31].

To the best of our knowledge, we provided the first qPCR-based study investigating the mitochondrial DNA copy number (mtCN) in

pancreatic cancer (PC) tissue derived from a resected tumor. In the literature, there is the study exploring the mitochondrial genome in pancreatic cancer cell lines and xenografts [32]. Jones et al. performed a Southern blot hybridization to determine the relative amounts of mtDNA in two sets of paired pancreatic cancer xenografts and tissue from the normal duodenum. The results from this study showed an increased intracellular mass of mtDNA in pancreatic cancer cells, which does not correspond to our results. However, Jones et al. comparison included only two pairs of samples. Here, it is worth to notice, that Reznik et al. (who indicated mtCN in over 1000 pairs of tumor/adjacent-normal samples from 15 cancer types) reported that in case of decreased mtDNA content tumors, despite a tendency towards mtDNA depletion, all tumor types contained at least one sample with higher mtDNA content than adjacent normal tissue [2].

The relation between mtDNA content and clinicopathological findings has been reported before for several types of cancer, but not for pancreatic ductal adenocarcinoma. Here, we report that mtDNA copy number decreased as the PC grading increased. Jonckheere-Terpstra testing indicated a statistically significant decrease trend in median mtCN across the differentiation (adjacent normal pancreatic tissue, low grade, intermediate grade, high grade). These observations are consistent with results of a study conducted by Yu et al., who demonstrated that lower mtDNA contents were significantly correlated with a higher histological grade in breast cancer patients [18]. Similarly, Zhang et al. demonstrated that mtDNA copy number was significantly negatively associated with tumor grade in glioma patients [33]. Regarding the lymph node involvement, our results showed no significant differences in mtCN between samples from tumors pathologically marked as N1 and specimens from tumors marked as N0. These results correspond to observations of studies carried out by Chang et al. (colorectal cancer) [34], Lee et al. (gastric cancer) [35] and by Yu et al. (breast cancer) [18]. Regarding margin status, both samples from tumors marked as R0 and from tumors marked as R1 had statistically significantly less mtCN compared to surrounding tissue, which is not surprising due to the fact that the samples from all tumors had statistically significantly less mtCN

compared to the surrounding tissue. Our results showed no significant differences in the mtCN values for tumors marked as R0 and tumors marked as R1. These results are consistent with observations of studies carried out by Chang et al. (colorectal cancer) [34] and Yamada et al. (hepatocellular carcinoma) [36]. Further, our results showed that there were no differences in relative mtDNA copy number between tumors localized in the head of the pancreas and tumors in other localization. This finding also corresponds to observations of studies carried out by Chang et al. (colorectal cancer) [34] and Zhang et al. (gastric cancer) [37].

To address a possible relation between mtDNA content and aggressive behavior *in vivo*, we analyzed primary resectable pancreatic tumor mtDNA content and prognosis in homogenous group of 43 pancreatic cancer patients. This article was the first to analyze the prognostic value of mitochondrial DNA copy number in pancreatic cancer. Our results failed to show an association between the tissue mtCN and overall survival. Nevertheless, they do correspond to conclusions of several studies on such cancers as colon and gastric cancer [35,38] as well as hepatocellular carcinoma [36].

A number of related open questions remain to be resolved, including what mechanisms determine the mtDNA depletion in pancreatic cancer, what are the consequences for cancer biology of mtDNA depletion at various levels and which agents affecting tissue mtCN could indicate the patients who may benefit from the evaluation of tissue mtCN as a potential important prognostic factor in resectable pancreatic cancer.

To conclude, we provided the first qPCR-based study investigating the mitochondrial DNA copy number in pancreatic cancer tissue and the impact of mtCN on overall survival in PC patients. We demonstrate significantly lower mtDNA content in pancreatic cancer tissue compared to adjacent normal tissue. Also, our results failed to prove that mitochondrial DNA copy number is a good prognostic marker in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. Larger cohorts of uniformly treated patients are necessary to validate these results and to further unravel the clinical relevance of mtDNA content determination in cancer.

Author contributions

1. Julia Tuchalska-Czuroń: project conceptualization, data curation, funding acquisition, investigation, resources, writing – original draft.
2. Jacek Lenart: project conceptualization, investigation, methodology, resources, writing – review, and editing.
3. Justyna Augustyniak: project conceptualization, formal analysis, methodology, resources, writing – review, and editing.
4. Marek Durlik: project conceptualization, funding acquisition, resources, supervision, writing – review, and editing.

Conflict of interest disclosure

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the Central Clinical Hospital of the Ministry of Interior Foundation and KNOW-MMRC project (KNOW-17).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.pan.2018.11.009>.

References

- [1] Satoh M, Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* 1991. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90467-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90467-9).
- [2] Reznik E, Miller ML, Şenbabaoglu Y, Riaz N, Sarungbam J, Tickoo SK, et al. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife* 2016;5. <https://doi.org/10.7554/eLife.10769>.
- [3] Lenart J. Mitochondria in brain hypoxia. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2017;71:118–28.
- [4] Kodroń A, Ghanim M, Krawczyk KK, Stelmaszczyk-Emmel A, Tońska K, Demkow U, et al. Mitochondrial DNA in pediatric leukemia patients. *Acta Biochim Pol* 2017;64:183–7. <https://doi.org/10.18388/abp.2016.1444>.
- [5] Yacoub HA, Mahmoud WM, El-Din El-Baz HA, Eid OM, ElFayoumi RI, Elhamidy SM, et al. Novel mutations in the displacement loop of mitochondrial DNA are associated with acute lymphoblastic leukemia: a genetic sequencing study. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2014;15:9283–9. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.21.9283>.
- [6] Hsu C-C, Tseng L-M, Lee H-C. Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression. *Exp Biol Med (Maywood)* 2016;3. <https://doi.org/10.1177/1535370216641787>. 1535370216641787.
- [7] Su X, Wang W, Ruan G, Liang M, Zheng J, Chen Y, et al. A comprehensive characterization of mitochondrial genome in papillary thyroid cancer. *Int J Mol Sci* 2016;17. <https://doi.org/10.3390/ijms17101594>.
- [8] Lin C-S, Lee H-T, Lee M-H, Pan S-C, Ke C-Y, Chiu A, et al. Role of mitochondrial DNA copy number alteration in human renal cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 2016;17:814. <https://doi.org/10.3390/ijms17060814>.
- [9] Fan AX-C, Radpour R, Haghighi MM, Kohler C, Xia P, Hahn S, et al. Mitochondrial DNA content in paired normal and cancerous breast tissue samples from patients with breast cancer. *J Canc Res Clin Oncol* 2009;135:983–9. <https://doi.org/10.1007/s00432-008-0533-9>.
- [10] Qu F, Liu X, Zhou F, Yang H, Bao G, He X, et al. Association between mitochondrial DNA content in leukocytes and colorectal cancer risk: a case-control analysis. *Cancer* 2011;117:3148–55. <https://doi.org/10.1002/ncr.25906>.
- [11] Shen J, Wan J, Song R, Zhao H. Peripheral blood mitochondrial DNA copy number, length heteroplasmy and breast cancer risk: a replication study. *Carcinogenesis* 2015;36:1307–13. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv130>.
- [12] Zhu X, Mao Y, Huang T, Yan C, Yu F, Du J, et al. High mitochondrial DNA copy number was associated with an increased gastric cancer risk in a Chinese population. *Mol Carcinog* 2017;56:2593–600. <https://doi.org/10.1002/mc.22703>.
- [13] Shen J, Song R, Lu Z, Zhao H. Mitochondrial DNA copy number in whole blood and glioma risk: a case control study. *Mol Carcinog* 2016;55:2089–94. <https://doi.org/10.1002/mc.22453>.
- [14] Shen J, Gopalakrishnan V, Lee JE, Fang S, Zhao H. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood and melanoma risk. *PLoS One* 2015;10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131649>.
- [15] Xu E, Sun W, Gu J, Chow WH, Ajani JA, Wu X. Association of mitochondrial DNA copy number in peripheral blood leukocytes with risk of esophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2013;34:2521–4. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt230>.
- [16] Meng S, De Vivo I, Liang L, Giovannucci E, Tang JY, Han J. Pre-diagnostic leukocyte mitochondrial DNA copy number and skin cancer risk. *Carcinogenesis* 2016;37:897–903. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw072>.
- [17] Lynch SM, Weinstein SJ, Virtamo J, Lan Q, Liu C-S, Cheng W-L, et al. Mitochondrial DNA copy number and pancreatic cancer in the alpha-tocopherol beta-carotene cancer prevention study. *Cancer Prev Res* 2011;4. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0002>. 1912–9.
- [18] Yu M, Zhou Y, Shi Y, Ning L, Yang Y, Wei X, et al. Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in Chinese breast cancer patients. *IUBMB Life* 2007;59:450–7. <https://doi.org/10.1080/15216540701509955>.
- [19] Feng D, Xu H, Li X, Wei Y, Jiang H, Xu H, et al. An association analysis between mitochondrial DNA content, G10398A polymorphism, HPV infection, and the prognosis of cervical cancer in the Chinese Han population. *Tumor Biol* 2016;37:5599–607. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4429-4>.
- [20] Xing F, Luan Y, Cai J, Wu S, Mai J, Gu J, et al. The anti-Warburg effect elicited by the cAMP-PGC1 α pathway drives differentiation of Glioblastoma cells into astrocytes. *Cell Rep* 2017;18:468–81. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.037>.
- [21] Tu H, Gu J, Meng QH, Kim J, Davis JW, He Y, et al. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood leukocytes and the aggressiveness of localized prostate cancer. *Oncotarget* 2015;6. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5889>.
- [22] Augustyniak J, Lenart J, Zychowicz M, Lipka G, Gaj P, Kolanowska M, et al. Sensitivity of hiPS-derived neural stem cells (NSC) to Pyrroloquinoline quinone depends on their developmental stage. *Toxicol Vitro* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.05.017>.
- [23] Augustyniak J, Lenart J, Zychowicz M, Stepien PP, Buzanska L. Mitochondrial biogenesis and neural differentiation of human iPSC is modulated by idebenone in a developmental stage-dependent manner. *BioGerontology* 2017;18:665–77. <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9718-4>.
- [24] Shiraiishi T, Verdone JE, Huang J, Kahlert UD, Hernandez JR, Torga G, et al. Glycolysis is the primary bioenergetic pathway for cell motility and

- cytoskeletal remodeling in human prostate and breast cancer cells. *Oncotarget* 2015;6:130–43. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2766>.
- [25] Fujisawa K, Terai S, Takami T, Yamamoto N, Yamasaki T, Matsumoto T, et al. Modulation of anti-cancer drug sensitivity through the regulation of mitochondrial activity by adenylate kinase 4. *J Exp Clin Canc Res* 2016;35:48. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0322-2>.
- [26] Sarnecka AK, Zagozda M, Durlík M. An overview of genetic changes and risk of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Canc* 2016;7:2045–51. <https://doi.org/10.7150/jca.15323>.
- [27] Durlík M, Tuchalska-Czuroń J. Ploidy and DNA index as prognostic factors in resected pancreatic ductal adenocarcinoma - a review of the literature. *Prze-gład Gastroenterol* 2014;9:313–6. <https://doi.org/10.5114/pg.2014.47892>.
- [28] Maher JC, Savaraj N, Priebe W, Liu H, Lampidis TJ. Differential sensitivity to 2-deoxy-d-glucose between two pancreatic cell lines correlates with glut-1 expression. *Pancreas* 2005;30. <https://doi.org/10.1097/01.mpa.0000153327.46945.26>.
- [29] Chen N, Wen S, Sun X, Fang Q, Huang L, Liu S, et al. Elevated mitochondrial DNA copy number in peripheral blood and tissue predict the opposite outcome of cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* 2016. <https://doi.org/10.1038/srep37404>.
- [30] Gardian K, Janczewska S, Durlík M. Microenvironment elements involved in the development of pancreatic cancer tumor. *Gastroenterol Res Pract* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/585674>.
- [31] Bai R-K, Chang J, Yeh K-T, Lou MA, Lu J-F, Tan D-J, et al. Mitochondrial DNA content varies with pathological characteristics of breast cancer. *J Oncol* 2011;2011:1–10. <https://doi.org/10.1155/2011/496189>.
- [32] 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;61:1299–304.
- [33] Zhang Y, Qu Y, Gao K, Yang Q, Shi B, Hou P, et al. High copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) predicts good prognosis in glioma patients. *Am J Cancer Res* 2015 Feb 15;5(3):1207–16. eCollection 2015.
- [34] Chang SC, Lin PC, Yang SH, Wang HS, Liang WY, Lin JK. Mitochondrial D-loop mutation is a common event in colorectal cancers with p53 mutations. *Int J Colorectal Dis* 2009. <https://doi.org/10.1007/s00384-009-0663-9>.
- [35] Lee H, Lee JH, Kim DC, Hwang IS, Kang YN, Gwon GJ, et al. Is mitochondrial DNA copy number associated with clinical characteristics and prognosis in gastric cancer? *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2015. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.1.87>.
- [36] Yamada S, Nomoto S, Fujii T, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, et al. Correlation between copy number of mitochondrial DNA and clinico-pathologic parameters of hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2006.01.002>.
- [37] Zhang G, Qu Y, Dang S, Yang Q, Shi B, Hou P. Variable copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) predicts worse prognosis in advanced gastric cancer patients. *Diagn Pathol* 2013. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-8-173>.
- [38] Mohideen AMSH, Dicks E, Parfrey P, Green R, Savas S. Mitochondrial DNA polymorphisms, its copy number change and outcome in colorectal cancer. *BMC Res Notes* 2015. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1250-5>.

Clinical value of tissue DNA integrity index in pancreatic cancer



Julia Tuchalska-Czuroń^{a,c,*}, Jacek Lenart^{b,1}, Justyna Augustyniak^b, Marek Durlik^{a,d,e}

^a Department of Surgical Research and Transplantology, Medical Research Centre Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

^b Department of Neurochemistry, Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

^c Diagnostic Radiology Department, Central Clinical Hospital of the MSWiA in Warsaw, Poland

^d Department of Gastroenterological Surgery and Transplantation Medicine, Centre of Postgraduate Medical Education, Warsaw, Poland

^e Clinical Department of Gastroenterological Surgery and Transplantation Medicine, Central Clinical Hospital of the MSWiA in Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2019

Received in revised form

8 October 2019

Accepted 28 October 2019

Available online 7 March 2020

Keywords:

DNA integrity index

Pancreatic cancer

ALU

LINE1

Resection margin

ABSTRACT

Background: DNA integrity index as a blood biomarker is associated with the prognosis of cancer patients.

Aims: The primary goal of the study was to examine tissue DNA integrity index (DII) in a group of pancreatic cancer (PC) tumor tissues and control adjacent pancreatic tissues. We also aimed to test the relationship between the tumor tissue DII and the clinicopathological parameters and the overall survival.

Methods: In the prospective study, DII was calculated using: the Alu 247/115 ratio, the LINE1 300/79 ratio and the average of the above values, based on the data obtained by real-time PCR. The tumors samples (n = 42) originated from the patients with pathologically confirmed pancreatic ductal adenocarcinoma and the control adjacent pancreatic tissue specimens (n = 32) were received from surgical margins.

Results: Specimens from the tumors pathologically marked as R1 (microscopic residual tumor) had a significantly higher LINE1 300/79 ratio values than specimens from adjacent normal pancreatic tissue (P<0.05). ROC curve analysis revealed that LINE1 300/79 ratio is a good parameter to distinguish between R0 and R1 tumors (AUC = 0.703, P<0.05).

Conclusions: This is the first study exploring the tissue DNA integrity index (DII) in pancreatic cancer. LINE1 DII can be used as auxiliary parameter for objective evaluation of margin status.

© 2020 Published by Elsevier Ltd on behalf of Royal College of Surgeons of Edinburgh (Scottish charity number SC005317) and Royal College of Surgeons in Ireland.

Introduction

DNA is a molecule that may be inside and outside the cell. Extracellular DNA can be found in the blood as well as other biological fluids. The degraded DNA fragments floating in the blood plasma are called circulating cell-free DNA (ccfDNA).

DNA present in the blood could be released from, among others, apoptotic or necrotic cells. DNA fragments length and DNA size distribution may indicate ccfDNA source (from apoptotic or necrotic cells).¹ Cell apoptosis occurs naturally, and DNA is cut into similar small fragments of 185–200 bp. Instead, tumor necrosis provides DNA fragments of different lengths generally >200bp.² Circulating tumor DNAs (ctDNAs)

* Corresponding author. Department of Surgical Research and Transplantology, Mossakowski Medical Research Centre Polish Academy of Sciences, Pawlowskiego 5, 02-106 Warsaw, Poland. Fax: +48 22 668 55 32.

E-mail address: jczuron@imdik.pan.pl (J. Tuchalska-Czuroń).

¹ Tribute to Jacek Lenart, PhD, who contribute to the work and passed away suddenly.

<https://doi.org/10.1016/j.surge.2019.10.008>

1479-666X/© 2020 Published by Elsevier Ltd on behalf of Royal College of Surgeons of Edinburgh (Scottish charity number SC005317) and Royal College of Surgeons in Ireland.

Abbreviations

ALU	Alu elements; transposable elements which belong to Short Interspersed Nuclear Elements
ccfDNA	circulating cell free DNA
CTC	circulating tumor cell
ctDNA	circulating tumor deoxyribonucleic acid
DII	DNA integrity index
DNA	deoxyribonucleic acid
G1	grade 1
G2	grade 2
G3	grade 3
IPMNs	Intraductal papillary mucinous neoplasms
IQR	<i>interquartile range</i>
LINE	Long interspersed nuclear elements
LINE1	Long interspersed element (LINE) 1 retrotransposons
MCNs	Pancreatic mucinous cystic neoplasms
N0	no cancer was found in the lymph nodes
N1	the cancer has spread to the regional lymph nodes
NX	undetermined lymph node involvement
NS	not statistically significant
PanIN	Pancreatic intraepithelial neoplasia
PC or PCA	pancreatic cancer
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
R0	microscopically margin-negative resection
R1	microscopic margins are positive for tumor resection margin
RM	resection margin
SINEs	short interspersed elements
qPCR	quantitative reverse transcription PCR
T2	for pancreatic cancer T2 means that tumor is larger than 2 cm but limited to the pancreas
T3	for pancreatic cancer T3 means that tumor has spread beyond the pancreas but it has not invaded neither the celiac axis nor the superior mesenteric artery
T4	for pancreatic cancer T4 means that tumor invades the celiac axis or the superior mesenteric artery
TX	main tumor cannot be measured

is tumor-derived fragmented DNA in the bloodstream that comes from the tumor or from circulating tumor cells (CTCs).³ Fig. 1 demonstrates the main sources of circulating cell-free DNA related to cancer. Outline of cfDNA research history can be found in the Supplement.^{32–35}

DNA integrity index (DII), which is the ratio of longer to shorter DNA fragments, became a potential marker for early detection, therapy response, and prognosis for cancer patients.⁴ According to the latest literature, DII was shown to be a helpful biomarker for detecting: hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, prostate cancer, acute myelogenous leukemia (AML), breast cancer, and melanoma.^{5–11} Moreover, DII was reported to be useful in monitoring the response to therapy in rectal cancer and nasopharyngeal carcinoma.^{12,13} In the literature, there are also studies exploring blood-

based DNA integrity index as a potential prognostic factor in: lymphoma, hepatocellular carcinoma, colorectal, breast and lung cancer.^{2,5,14–17} However, DNA analysis can be performed on the base of both ctDNA (from a liquid biopsy) and DNA derived directly from tumor tissue obtained by resection or biopsy.¹⁸ Tumor necrosis is the source of longer DNA fragments. Therefore, changes in DNA integrity index in tumor tissue should reflect the alterations observed in the blood.

DNA integrity index (DII) is most often evaluated using ALU and/or LINE1 amplicons. More about ALU and LINE elements and why they are most often used for DII evaluation^{19–25} can be found in the Supplement.

The primary goal of the study was to examine tissue DNA integrity index (DII) in a group of pancreatic cancer (PC) tumor tissues and control adjacent pancreatic tissues. We also aimed to test the relationship between the tumor tissue DII and the clinicopathological parameters and the overall survival. In this prospective study we evaluated DNA integrity index using: ALU ratio (q-PCR results of ALU227/ALU115 bp), LINE1 ratio (q-PCR results of LINE1 300/LINE1 79 bp) and the average of above values. Our purpose was to check the clinical value of tissue DNA integrity index in patients with pancreatic cancer. There are many studies that have analyzed DNA integrity index in the blood, but not directly in the tumor tissue. To our knowledge, this is the first study exploring the tissue DNA integrity index in the pancreatic cancer.

Materials and methods

Study population and data collection

The study has obtained ethics committee approval (by the Medical Ethics Committee of the Central Clinical Hospital of the Ministry of the Interior and Administration in Warsaw, Poland). Patients informed consent was obtained prior to enrollment. Among the cancer group, all patients had pathologically confirmed pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and all these patients were treated with gemcitabine after an operation. Most of the cancer patients (40/42) had resectable tumors. In two cases, during the operation, a liver nodule was resected, which was pathologically confirmed as pancreatic cancer metastasis. Further, most of the cancer patients (41/42) did not take any neoadjuvant systemic therapy. One patient received gemcitabine before the cancer surgery. In the non-cancer group, the control adjacent pancreatic tissue specimens were acquired from the surgical margin. All the operations were performed due to imagine diagnostics of pancreatic tumors, in a single center - Clinical Department of Gastroenterological Surgery and Transplantation Central Clinical Hospital of the Ministry of the Interior and Administration in Warsaw, Poland. We have prospectively gathered 73 fresh frozen specimens: 42 samples of PDAC and 31 samples from surgical margins. The specimens were collected between December 2013 and June 2016. The histopathology examinations were performed according to WHO criteria. Regarding the surgical margin status, absence of tumor cells within 1 mm to the specimen surface was considered the R0 resection. Follow-up was continued until January 2017.

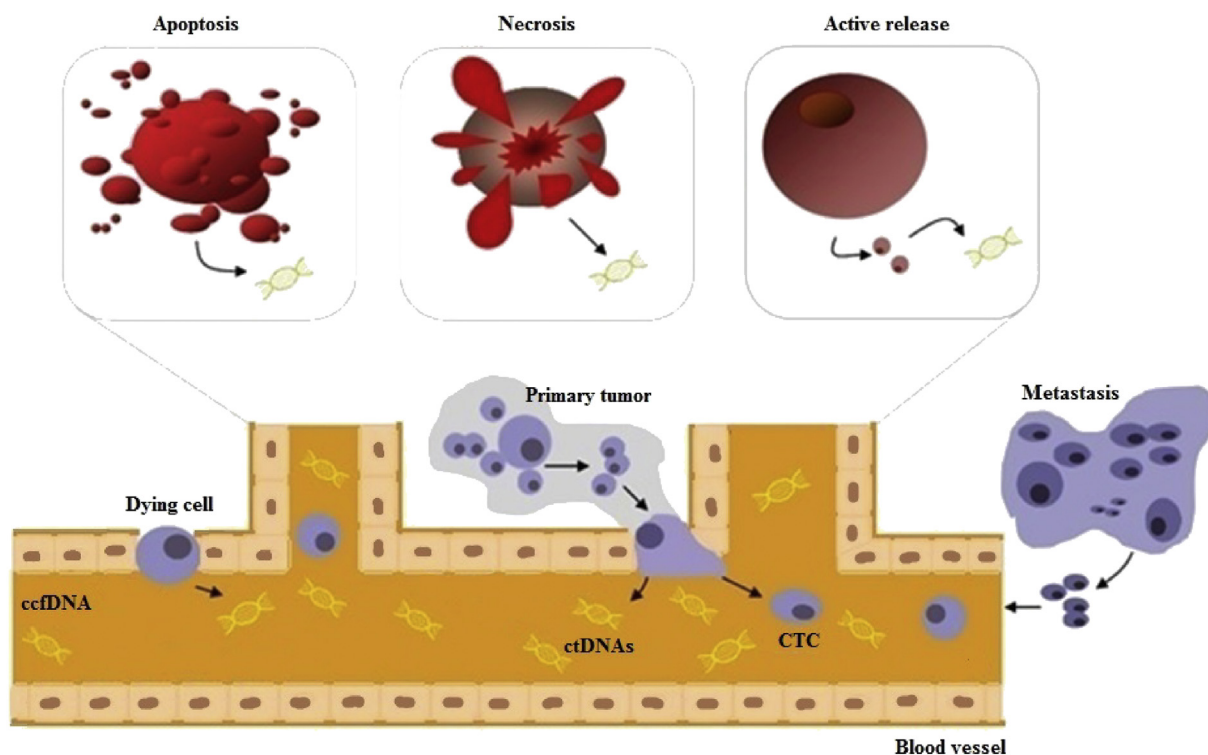


Fig. 1 – The main sources of circulating cell free DNA related to the cancer. Adapted from Schwarzenbach et al.³⁸ ccfDNA - circulating cell free DNA; CTC – circulating tumor cells; ctDNA - circulating tumor DNA.

DNA isolation

Genomic Mini kit (A&A Biotechnology) was used for genomic DNA isolation. DNA purification was accomplished according to the producer's instructions. A NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) was used to measure the absorbance at 260 nm for obtaining the extracted DNA concentration. Before DNA isolation, tissues were stored at -80°C . Isolated DNA was stored at -20°C .

Measurements of DNA integrity index

The DNA integrity index in the 1) tumor tissues and 2) control adjacent tissues was measured by real-time PCR, according to standard practice.^{26–28} Details about DII measurements can be found in the Supplement.

Statistical analysis

All specimens were running in the 3 replicates. Statistics were carried out using GraphPad Prism 5.0 (Graphpad Software Inc. La Jolla, USA) and PQStat (PQStat software, Poland). The normality test was Shapiro–Wilk test. The Fisher's exact test and student t-test were used to compare study groups regarding sex and age, respectively. The Mann Whitney tests were used to evaluate the differences in DII values between: 1) pancreatic cancer tissue and adjacent normal tissue; 2) tissues from head-localized tumors and from tumors in other localization; 3) tissues from N0 tumors and from N1 tumors.

Kruskal–Wallis tests were used to evaluate the differences in DII values between: 1) adjacent normal tissue samples, samples from G1 tumors, G2 tumors and from G3 tumors; 2) adjacent normal tissue samples, samples from R0 tumors and from R1 tumors. Dunn's Multiple Comparison test was used as a post-test. The Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis between adjacent normal and tumor tissue was performed to decide the cut-off point before Kaplan–Meier survival curves were performed. The Log-rank (Mantel–Cox) Test was used as a post-test. Data in text and the results shown on the charts were presented as a median with interquartile range (IQR). A P value of 0.05 was considered statistically significant.

Results

The obtained results (73 in total) consisted of 42 results from the PC group and 31 results from the control group. In the PC group, the mean age was 63.60 (ranging from 40 to 84), and there were 45.24% females and 54.76% males. In the control group, the mean age was 64.19 (ranging from 37 to 84), and there were 48.39% females and 51.61% males. These baseline characteristics of the study population are summarized in Table 1. More information on this topic can be found in the Supplement. There were no significant differences between the two groups regarding age, ethnicity, and sex. Table 2 contains the basic characteristics of the PC group. These basic characteristics includes tumor size staging, lymph node status, differentiation

Table 1 – Distribution of selected characteristics of pancreatic cancer cases and controls. NS- not statistically significant. NS – P > 0.05

Characteristics	Cancer group (n = 42)	Controls (n = 31)	P-value
	N (%)	N (%)	
Ethnicity			
White	42 (100.0)	31 (100.0)	NS
Sex			
Male	23 (54.76)	16 (51.61)	NS
Female	19 (45.24)	15 (48.39)	
Age (mean; years)	63.60	64.19	NS

grade, location within the pancreas, surgical margin status, and the presence of accompanying precancerous lesions.

Determination of tumor DNA integrity index in the pancreatic cancer tissue vs. control adjacent pancreatic tissue

DNA integrity index was calculated using: the Alu 247/115 ratio, the LINE1 300/79 ratio and the average of the above values. The median value of Alu247/115 ratio and interquartile

Table 2 – Baseline characteristics of cancer group included pancreatic cancer staging according to TNM classification; differentiation grade; sublocation of the tumor; surgical margin status; and the presence of the precancerous lesions. PanIN – Pancreatic intraepithelial neoplasia; IPMNs – Intraductal papillary mucinous neoplasms; MCNs – Pancreatic mucinous cystic neoplasms.

Characteristics	Cancer group (n = 42)
	N (%)
Extent of primary tumor	
T2	2 (4.76)
T3	38 (90.48)
T4 (borderline)	2 (4.76)
Lymph node involvement	
N0	5 (11.90)
N1	36 (85.71)
Nx	1 (2.38)
Metastases	
M0	40 (95.24)
M1	2 (4.76)
Differentiation grade	
Poor	4 (9.52)
Moderate	28 (66.66)
Well	9 (21.43)
Undetermined	1 (2.38)
Sublocation	
Head	35 (83.33)
Head and body	3 (7.14)
Body and tail	2 (4.76)
Other	2 (4.76)
Surgical margin status	
R0	15 (35.71)
R1	26 (61.90)
Undetermined	1 (2.38)
The presence of the precancerous lesions	
PanIN	12 (28.57)
IPMNs	3 (7.14)
MCNs	0 (0)

ranges in the PC group and in the control group were respectively 1.23 (IQR 1.92) and 1.14 (IQR 0.76). The median value of LINE1300/79 ratio and interquartile ranges in the PC group and in the control group were respectively 1.24 (IQR 5.43) and 0.87 (IQR 3.67). The median value of DNA integrity index understood as an average of Alu247/115 ratio and LINE1300/79 ratio and interquartile ranges in the PC group and in the control group were respectively 1.24 (IQR 4.08) and 1.03 (IQR 2.43). Tissue DNA integrity index (as the Alu247/115 ratio, LINE1300/79 ratio and the average of above values) in pancreatic tumors tissue was higher than DII in control adjacent pancreatic tissue, but the difference was not significant (P = 0.72 for Alu ratio, P = 0.09 for LINE1 ratio, P = 0.50 for the average). Data were shown in Fig. 2A. Next, a receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was done to indicate an optimal threshold of tissue DNA integrity index (DII) for cancer. Regarding the DII understood as an Alu247/115 ratio, the area under the ROC curve (AUC) for cancer was 0.525 (P = 0.71) and the cut-off point was 1.7411, with a sensitivity of 45.2% and a specificity of 78.1%. These data can be found in Fig. 2B. Regarding the LINE1300/79 ratio, AUC for cancer was 0.6153 (P = 0.09) and the cut-off point was 0.9054, with a sensitivity of 71.4% and a specificity of 59.4%. Data were shown in Fig. 2C. Regarding the DII understood as an average of Alu247/115 ratio and LINE1300/79 ratio, the area under the ROC curve (AUC) for cancer was 0.546 (P = 0.50) and the cut-off point was 1.1869, with a sensitivity of 52.4% and a specificity of 68.8%. These data can be found in Fig. 2D.

Determination of relation between tissue DNA integrity index and the tumor resection margin status of pancreatic cancer group

Concerning the relation between tissue DII and a resection margin, specimens from tumors pathologically marked as R1 (microscopic residual tumor) had a significantly higher LINE1 300/79 ratio values (median 1.99; IQR 8.64) than specimens from control adjacent pancreatic tissue (median 0.87; IQR 3.67), P<0.05. Data was shown in Fig. 3A. We then performed a receiver operating characteristic (ROC) curve analysis to indicate an optimal threshold of tissue DII based on a LINE1 300/79 ratio which distinguishes between normal pancreatic tissue and R1 pancreatic cancer tumors. The area under the ROC curve (AUC) was 0.69 (P<0.05) and the cut-off point was 0.9054, with a sensitivity of 84.6% and a specificity of 59.4%. Data were shown in Fig. 3B. What is interesting, the same cut-off point = 0.9054 was shown in the ROC curve analysis performed to determine the threshold of tissue DII based on a LINE1 ratio which distinguishes between R1 tumors and specimens from tumors pathologically marked as R0 (microscopically margin-negative resection). In this case, the area under the ROC curve (AUC) was 0.703 (P<0.05), with a sensitivity of 84.6% and a specificity of 57.1%. Fig. 3C illustrates these data.

Determination of relation between tumor DNA integrity index and the other clinico-pathological characteristics of pancreatic cancer group

Our results showed that DNA integrity index in pancreatic tumors was higher than DII in adjacent normal pancreatic tissue, but the difference was not significant (P = 0.72 for Alu

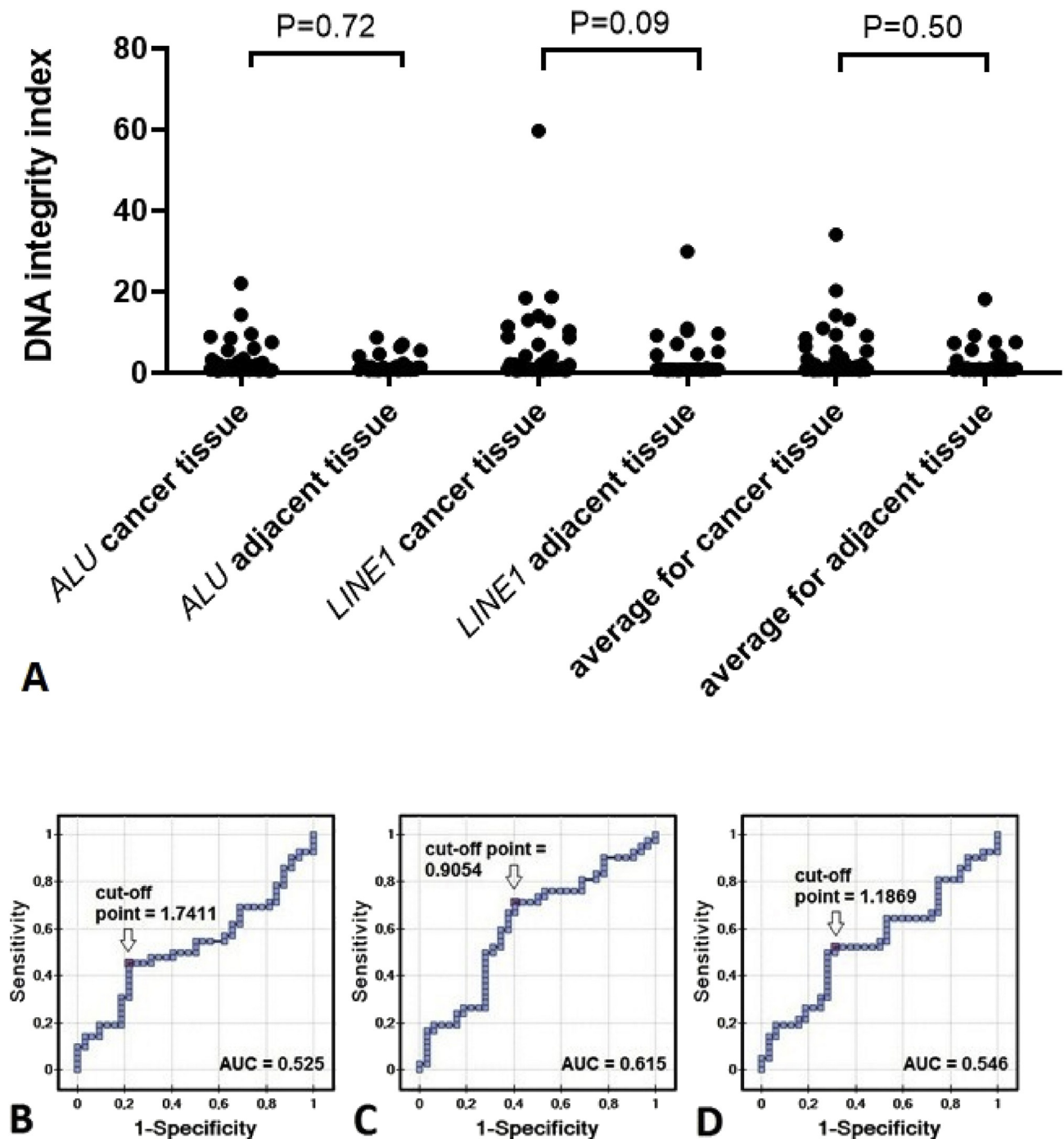


Fig. 2 – (A) The tissue DNA integrity index in the pancreatic cancer tissue and the control adjacent pancreatic tissue. The tissue DNA integrity index was calculated using: the Alu 247/115 ratio, the LINE1 300/79 ratio, and the average of the above values. (B) Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to determine an optimal threshold of DNA integrity index understood as an Alu247/115 ratio for pancreatic cancer. (C) Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to determine an optimal threshold of DNA integrity index understood as a LINE1300/79 ratio for pancreatic cancer. (D) Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to determine an optimal threshold of DNA integrity index DII understood as an average of Alu247/115 ratio and LINE1300/79 ratio for pancreatic cancer. AUC – area under the curve.

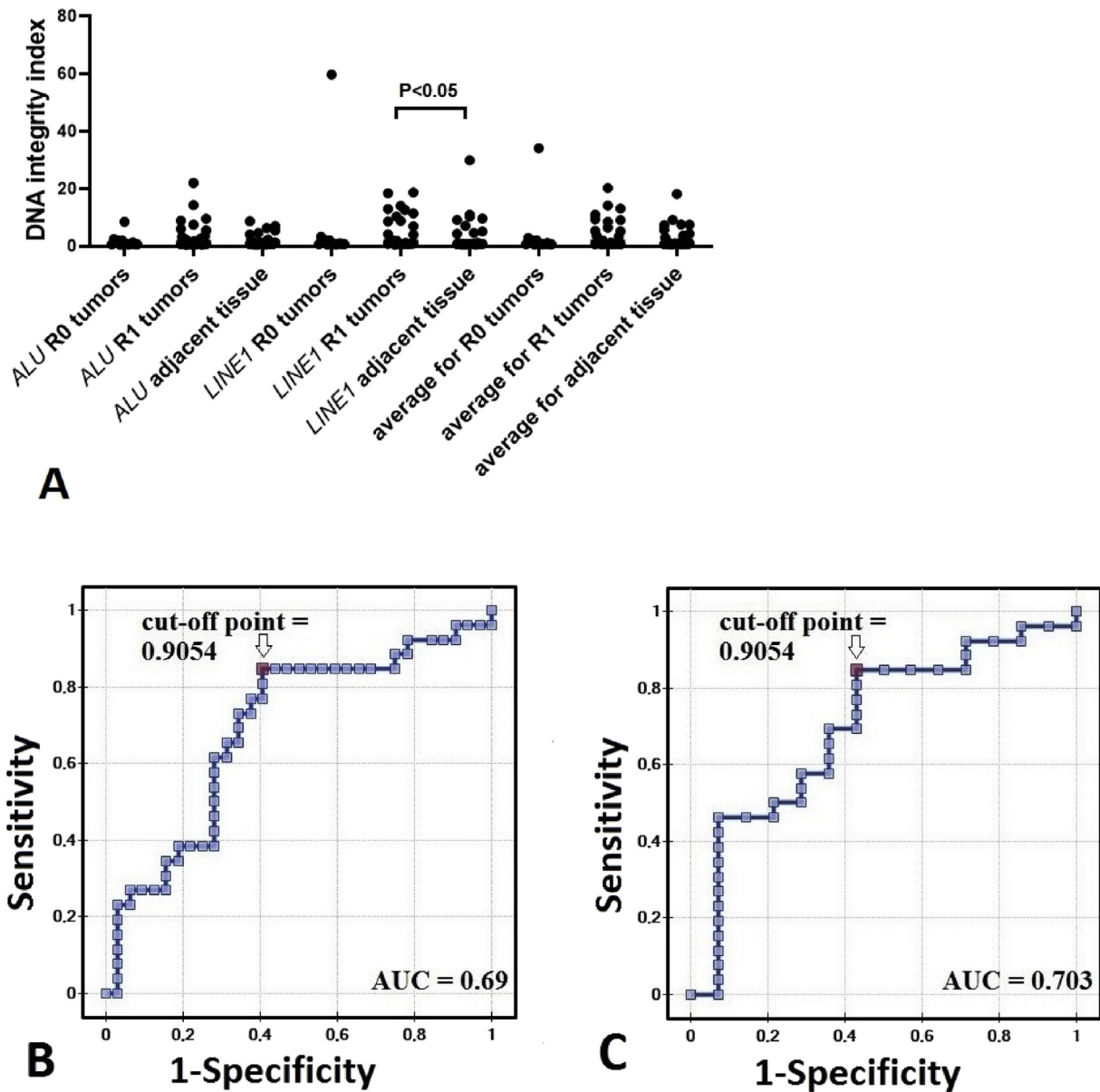


Fig. 3 – (A) Tumor DNA integrity index (*Alu*247/115 ratio, *LINE1* 300/79 ratio and the average of above values) in the control adjacent pancreatic tissue and in the tumors that were pathologically marked as R0 and R1 according to the resection margin status. **(B)** Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to determine an optimal threshold of DNA integrity index understood as a *LINE1* 300/79 ratio which distinguish between the control adjacent pancreatic tissue and tumors pathologically marked as R1, $P < 0.05$. **(C)** Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to determine an optimal threshold of DNA integrity index DII understood as a *LINE1*1300/79 ratio which distinguish between tumors pathologically marked as R0 and R1, $P < 0.05$. AUC – area under the curve.

ratio, $P = 0.09$ for *LINE1* ratio, $P = 0.50$ for the average). Regarding tumor grading, there were no significant differences in DII between tumors with various differentiations. *Alu* ratio medians for G1, G2, and G3 tumors were respectively: 1.06; 1.62; 0.82; $P = 0.94$. *LINE1* ratio medians for G1, G2, and G3 tumors were respectively: 1.30; 1.57; 0.94; $P = 0.31$. Regarding the DII understood as an average of *Alu* and *LINE1* ratio, the

medians for G1, G2, and G3 tumors were respectively: 1.14; 1.59; 0.88; $P = 0.88$. These data can be found in Fig. 4A.

As regards lymph node status, there were no significant differences in DII between N1 tumors (tumors that spread to regional lymph nodes) and N0 tumors (no cancer in nearby lymph nodes). *Alu* ratio medians for N1 and N0 tumors were respectively: 1.23 and 1.97; $P = 0.80$. *LINE1* ratio medians for N1

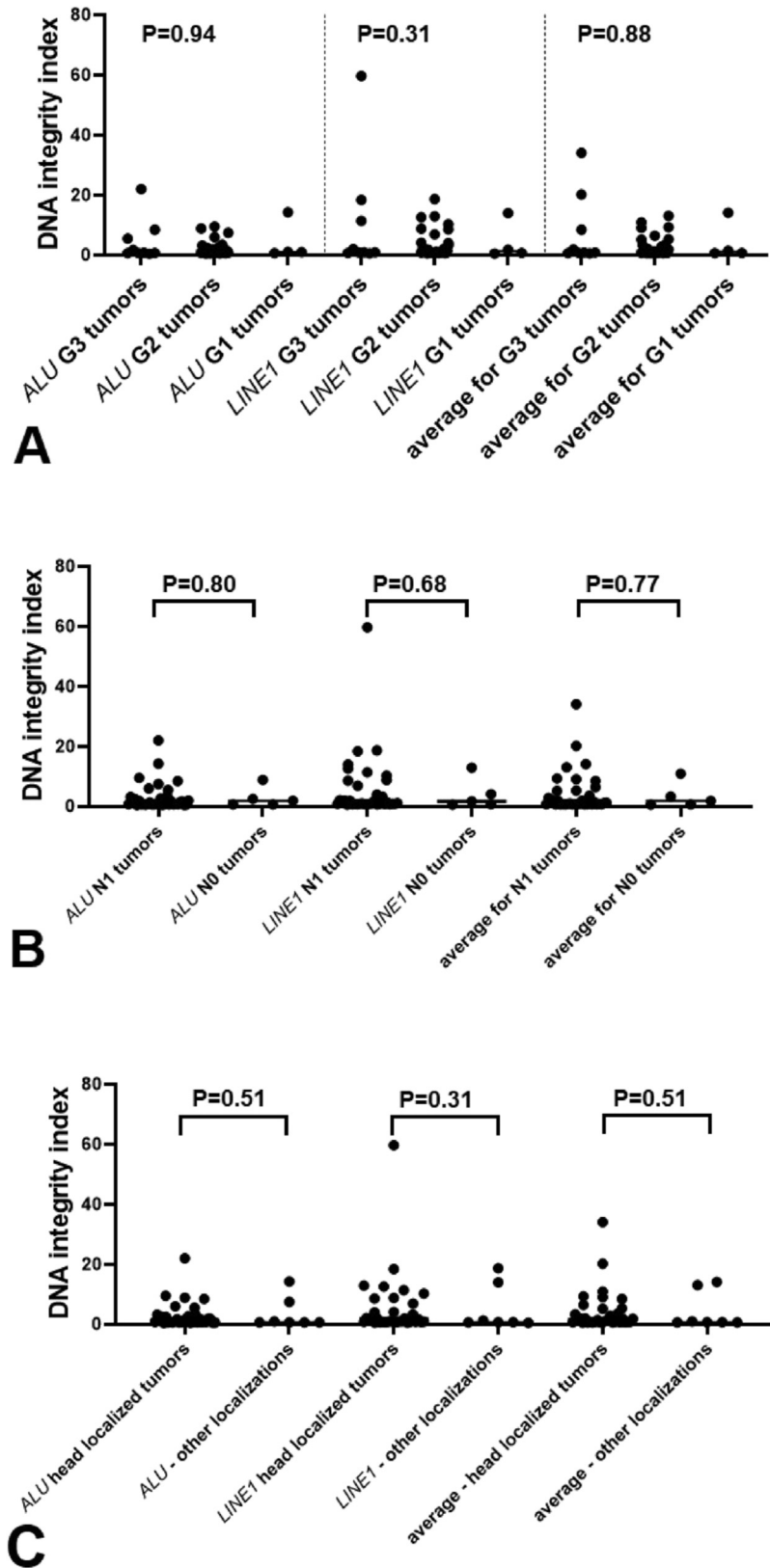
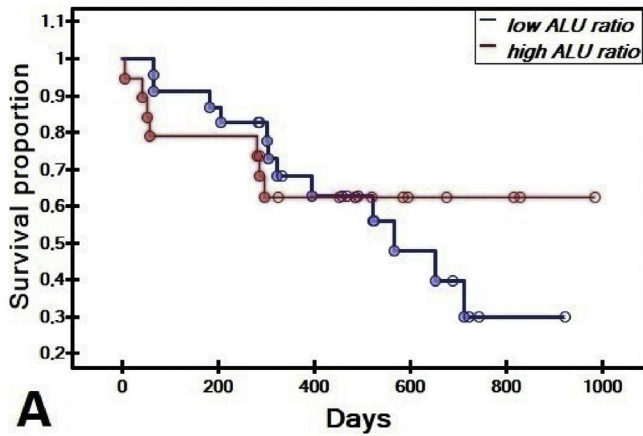
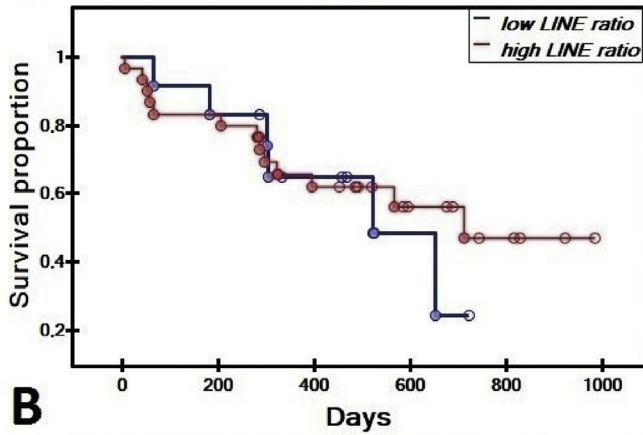


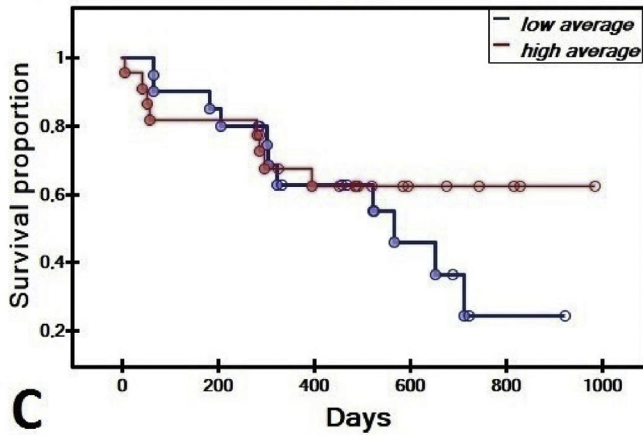
Fig. 4 – (A) The tissue DNA integrity index (Alu247/115 ratio, LINE1 300/79 ratio and the average of above values) measured in pancreatic ductal adenocarcinoma pathologically marked as G1, G2 and G3 according to the tumor differentiation. (B) The impact of the tumor DNA integrity index (Alu247/115 ratio, LINE1 300/79 ratio and the average of above values) on the lymph node involvement. (C) The impact of pancreatic cancer tumor localization on the tumour DNA integrity index (Alu247/115 ratio, LINE1 300/79 ratio and the average of above values). Other localizations refer to: the tumors in the body of the pancreas, in the tail of the pancreas and diffuse tumors.



A



B



C

DNA integrity index (DII)	Median survival for lower DII values [days]	Median survival for higher DII values [days]	HR	95% CI	P value
<i>Alu</i> ratio	566	N/A	1.24	0.5-3.09	0.65
<i>LINE1</i> ratio	523	711	1.21	0.44-3.31	0.7
The average	566	N/A	1.45	0.59-3.56	0.42

D

Fig. 5 – (A) Tissue DNA integrity index (DII) measured as *Alu*247/115 ratio and survival. Kaplan–Meier curves present the overall survival of patients with pancreatic cancer with higher and lower tumor DII, until 2.7 years of follow-up. Results

and N0 tumors were respectively: 1.24; 1.79; $P = 0.68$. Regarding the DII understood as an average of *Alu* and *LINE1* ratio, the medians for N1 and N0 tumors were respectively: 1.24 and 1.88; $P = 0.77$. Fig 4B illustrates these data.

In terms of the PC localization, there were no significant differences in DII between head-localized tumors and tumors in other localizations within the pancreas. *Alu* ratio medians for head localized tumors and for tumors with other localizations were respectively: 1.60 and 0.73; $P = 0.51$. *LINE1* ratio medians for head localized tumors and for tumors with other localizations were respectively: 1.83; 0.76; $P = 0.31$. Regarding the DII understood as an average of *Alu* and *LINE1* ratio, the medians for head localized tumors and for tumors with other localizations were respectively: 1.68 and 0.80; $P = 0.51$. Data were shown in Fig. 4C.

Prognostic value of tumor DNA integrity index in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma

A receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was done to indicate an optimal threshold of tissue DNA integrity index (*Alu*247/115 ratio, *LINE1* 300/79 ratio and the average of the above values) for cancer. Based on ROC-generated DII cut-off points (for each of the ratios), PC patients were classified with high or low DII status. Then we have performed a survival analysis with the Kaplan–Meier method and confronted the results with the log-rank (Mantel–Cox) test. The results have not proved that the tissue DNA integrity index has prognostic value for the patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. Fig. 5 illustrates these data.

Discussion

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common type of pancreatic cancer. Prognosis for PDAC is very bad and has not changed significantly for decades. Initially, it is an insidious disease for which there is no effective widely recognized screening. Therefore the majority of patients have an unresectable tumor at the time of diagnosis. The mean survival for these patients is 3–6 months.^{29–31,37} Only 10–20% of PC patients may have surgery, which remains the only way to curative treatment. Among patients undergoing surgery, resection margin (RM) involvement is one of the most important prognostic factors. However, the rates of microscopic margin involvement (R1) vary markedly between studies (from below 20% to over 75%). This wide variation of R1 rates can be caused by: heterogeneous nomenclature, lack of

standardization of histopathology examination, and disagreement over the definition of microscopic margin involvement.³⁹ Our preliminary results showed that *LINE1* DNA integrity index is a good parameter to distinguish between R0 and R1 tumors and therefore it can help with objective evaluation of margin status.

Blood-based DNA integrity index is a promising prognostic factor in many types of cancer^{2,14–17} and one of the few exceptions is pancreatic cancer.³⁶ Sikora with colleagues proved that plasma cfDNA levels and DNA integrity index cannot be used for clinical purposes in pancreatic cancer patients. In that study, necrosis-derived cfDNA fragments were barely detectable in the blood samples and, consequently, DNA integrity index estimation was significantly affected by the limited detectability of longer DNA fragments. Utomo with colleagues confirmed these results showing no differences in cfDNA integrity index between sera from healthy controls and pancreatic cancer patients.⁴⁰ The findings of above studies can be explained by the results of study carried out by Jahr et al.⁴¹ In this study, the authors showed that the percentage of cfDNA originating from tumor cells ranges from 10% to 90% of total cfDNA. Therefore, the applicability of serum-based DNA integrity index may depend on the cancer type.

In their study, Utomo with colleagues⁴⁰ also showed no differences in cfDNA (including integrity) in cyst fluid from high and low risk pancreatic cyst patients. These results can correspond with our findings. In our study, we found a significant difference in DII between the control tissue and tissue from tumors that were pathologically marked as R1. These are tumors with more dynamic biology. It is conceivable that pancreatic tumor cells start to produce more necrotic DNA fragments only at certain point in its development.

Because of devastating prognosis for pancreatic cancer, there is an urgent need to recognize screening. Corral with colleagues⁴² proposed magnetic resonance imaging (MRI) and endoscopic ultrasound (EUS). Taking into account the results of our research and the results of the recent study by Utomo et al.,⁴⁰ we would not recommend DNA integrity index tests for pancreatic cancer screening. However, DNA integrity index measurements can be useful in objective margin status evaluation and to indicate tumors with more dynamic biology.

There are still many open questions, like for example what mechanisms determine the changes of DNA integrity index in cancer, and what are the consequences of producing more necrotic DNA fragments.

were compared with the logrank (Mantel–Cox) Test. There were no significant differences in survival between the patients with higher and lower tumor DII ($P > 0.05$). (B) Tissue DNA integrity index (DII) measured as *LINE1* 300/79 ratio and survival. Kaplan–Meier curves present the overall survival of patients with pancreatic cancer with higher and lower tumor DII, until 2.7 years of follow-up. Results were compared with the logrank (Mantel–Cox) Test. There were no significant differences in survival between the patients with higher and lower tumor DII ($P > 0.05$). (C) Patient survival and tissue DNA integrity index (DII) measured as an average of *Alu*247/115 ratio and *LINE1* 300/79 ratio. Kaplan–Meier curves present the overall survival of patients with pancreatic cancer with higher and lower tumor DII, until 2.7 years of follow-up. Results were compared with the logrank (Mantel–Cox) Test. There were no significant differences in survival between the patients with higher and lower tumor DII ($P > 0.05$). (D) Survival analysis parameters. N/A – not available.

Conclusions

To our knowledge, this is the first study exploring the tissue DNA integrity index (DII) in pancreatic cancer. The results showed that LINE1 DNA integrity index is a good parameter to distinguish between R0 and R1 tumors and therefore it can help with objective evaluation of margin status and to identify tumors with more dynamic biology.

Statement of ethics

The study has obtained ethics committee approval (by the Medical Ethics Committee of the Central Clinical Hospital of the Ministry of the Interior and Administration in Warsaw, Poland). Patients informed consent was obtained prior to enrollment.

Conflict of interest disclosure

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work is a tribute to our dear friend Jacek Lenart who contributed to the work and passed away suddenly. The work was supported by the Central Clinical Hospital of the Ministry of Interior and Administration Foundation and KNOW-MMRC project (KNOW-17). The authors would also like to thank Marcin Jurek from Texas A&M University for his support in statistics.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.surge.2019.10.008>.

REFERENCES

- Jiang W-W, Zahurak M, Goldenberg D, Milman Y, Park HL, Westra WH, et al. Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients. *Int J Canc* 2006;119:2673–6. <https://doi.org/10.1002/ijc.22250>.
- Chudasama DY, Aladag Z, Felicien MI, Hall M, Beeson J, Asadi N, et al. Prognostic value of the DNA integrity index in patients with malignant lung tumors. *Oncotarget* 2018;9. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25086>.
- Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Canc* 2011. <https://doi.org/10.1038/nrc3066>.
- Yu J, Gu G, Ju S. Recent advances in clinical applications of circulating cell-free DNA integrity. *Lab Med* 2014;45(1):6–11. Winter.
- El-Shazly SF, Eid MA, El-Souroy HA, Attia GF, Ezzat SA. Evaluation of serum DNA integrity as a screening and prognostic tool in patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Markers* 2010 Apr-Jun;25(2):79–86.
- Chen H, Sun LY, Zheng HQ, Zhang QF, Jin XM. Total serum DNA and DNA integrity: diagnostic value in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Pathology* 2012 Jun;44(4):318–24. <https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e328353a24c>.
- Mead R, Duku M, Bhandari P, Cree IA. Circulating tumour markers can define patients with normal colons, benign polyps, and cancers. *Br J Canc* 2011 Jul 12;105(2):239–45. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.230>. Epub 2011 Jun 28.
- Hanley R1, Rieger-Christ KM, Canes D, Emara NR, Shuber AP, Boynton KA, et al. DNA integrity assay: a plasma-based screening tool for the detection of prostate cancer. *Clin Canc Res* 2006 Aug 1;12(15):4569–74.
- Gao YJ, He YJ, Yang ZL, Shao HY, Zuo Y, Bai Y, et al. Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia. *Clin Chem Lab Med* 2010 Nov;48(11):1651–6. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.311>. Epub 2010 Sep. 13.
- Sunami E, Vu AT, Nguyen SL, Giuliano AE, Hoon DS. Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2008 Aug;1137:171–4. <https://doi.org/10.1196/annals.1448.011>.
- Pinzani P, Salvianti F, Zaccara S, Massi D, De Giorgi V, Pazzagli M, et al. Circulating cell-free DNA in plasma of melanoma patients: qualitative and quantitative considerations. *Clin Chim Acta* 2011 Nov 20;412(23–24):2141–5. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.07.027>. Epub 2011 Aug 3.
- Agostini M, Pucciarelli S, Enzo MV, Del Bianco P, Briarava M, Bedin C, et al. Circulating cell-free DNA: a promising marker of pathologic tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2011 Sep;18(9):2461–8. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-1638-y>. Epub 2011 Mar 17.
- Chan KC, Leung SF, Yeung SW, Chan AT, Lo YM. Persistent aberrations in circulating DNA integrity after radiotherapy are associated with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clin Canc Res* 2008 Jul 1;14(13):4141–5. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0182>.
- Li M, Jia Y, Xu J, Cheng X, Xu C. Assessment of the circulating cell-free DNA marker association with diagnosis and prognostic prediction in patients with lymphoma: a single-center experience. *Ann Hematol* 2017;96:1343–51. <https://doi.org/10.1007/s00277-017-3043-5>.
- El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, Bascoul-Mollevi C, Gillet B, Nouaille M, et al. Circulating DNA as a strong multimarker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. *Clin Canc Res* 2016. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0297>.
- Cheng J, Holland-Letz T, Wallwiener M, Surowy H, Cuk K, Schott S, et al. Circulating free DNA integrity and concentration as independent prognostic markers in metastatic breast cancer. *Breast Canc Res Treat* 2018. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4666-5>.
- Iqbal S, Vishnubhatla S, Raina V, Sharma S, Gogia A, Deo SSV, et al. Circulating cell-free DNA and its integrity as a prognostic marker for breast cancer. *SpringerPlus* 2015;4. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1071-y>.
- Akca H, Demiray A, Yaren A, Bir F, Koseler A, Iwakawa R, et al. Utility of serum DNA and pyrosequencing for the detection of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Canc Genet* 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2013.01.005>.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001. <https://doi.org/10.1038/35057062>.
- Deininger P. Alu elements: know the SINES. *Genome Biol* 2011 Dec 28;12(12):236. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-12-236>.

21. Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet* 2003. <https://doi.org/10.1038/ng1223>.
22. McCarthy EM, McDonald JF. Long terminal repeat retrotransposons of *Mus musculus*. *Genome Biol* 2004. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-3-r14>.
23. Tangkijvanich P, Hourpai N, Rattanatanyong P, Wisedopas N, Mahachai V, Mutirangura A. Serum LINE-1 hypomethylation as a potential prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.12.029>.
24. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem* 2006. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.068577>.
25. Cheng J, Cuk K, Heil J, Golatta M, Schott S, Sohn C, et al. Cell-free circulating DNA integrity is an independent predictor of impending breast cancer recurrence. *Oncotarget* 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17384>.
26. Agostini M, Enzo MV, Bedin C, Belardinelli V, Goldin E, Del Bianco P, et al. Circulating cell-free DNA: a promising marker of regional lymphnode metastasis in breast cancer patients. *Canc Biomarkers* 2012. <https://doi.org/10.3233/CBM-2012-0263>.
27. Sunami E, Vu AT, Nguyen SL, Giuliano AE, Hoon DSB. Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2008. <https://doi.org/10.1196/annals.1448.011>.
28. Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, Moore KJ, Goodman SN, Shuber AP, et al. Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology* 2008. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.039>.
29. Sarnecka AK, Zagozda M, Durlik M. An overview of genetic changes and risk of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Canc* 2016;7:2045–51. <https://doi.org/10.7150/jca.15323>.
30. Durlik M, Tuchalska-Czuroń J. Ploidy and DNA index as prognostic factors in resected pancreatic ductal adenocarcinoma - a review of the literature. *Przegląd Gastroenterol* 2014;9:313–6. <https://doi.org/10.5114/pg.2014.47892>.
31. Maher JC, Savaraj N, Priebe W, Liu H, Lampidis TJ. Differential sensitivity to 2-deoxy-d-glucose between two pancreatic cell lines correlates with glut-1 expression. *Pancreas* 2005;30. <https://doi.org/10.1097/01.mpa.0000153327.46945.26>.
32. Vizza E, Corrado G, De Angeli M, Carosi M, Mancini E, Baiocco E, et al. Serum DNA integrity index as a potential molecular biomarker in endometrial cancer. *J Exp Clin Canc Res* 2018. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0688-4>.
33. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Ses Fil* 1948. <https://doi.org/10.1007/BF00832140>.
34. Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E. Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. *Science* 1965;(80-). <https://doi.org/10.1126/science.148.3668.374>.
35. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989. <https://doi.org/10.1159/000226740>.
36. Sikora K, Bedin C, Vicentini C, Malpeli G, D'Angelo E, Sperandio N, et al. Evaluation of cell-free DNA as a biomarker for pancreatic malignancies. *Int J Biol Markers* 2015;30:e136–41. <https://doi.org/10.5301/ijbm.5000088>.
37. Gardian K, Janczewska S, Durlik M. Microenvironment elements involved in the development of pancreatic cancer tumor. *Gastroenterol Res Pract* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/585674>.
38. Schwarzenbach H, Hoon D, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Canc* 2011;11:426–37.
39. Verbeke CS, Menon KV. Redefining resection margin status in pancreatic cancer. *HPB* 2009 Jun;11(4):282–9. <https://doi.org/10.1111/j.1477-2574.2009.00055.x>.
40. Utomo WK, Janmaat VT, Verhaar AP, Cros J, Lévy P, Ruzzniewski P, et al. DNA integrity as biomarker in pancreatic cyst fluid. *Am J Cancer Res* 2016;6(8):1837–41. Published online 2016 Aug 1. PMID: PMC5004084.
41. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Canc Res* 2001 Feb 15;61(4):1659–65.
42. Corral JE, Das A, Bruno MJ, Wallace MB. Cost-effectiveness of pancreatic cancer surveillance in high-risk individuals: an economic analysis. *Pancreas* 2019 Apr;48(4):526–36. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001268>.

Ploidy and DNA index as prognostic factors in resected pancreatic ductal adenocarcinoma – a review of the literature

Marek Durlik^{1,2}, Julia Tuchalska-Czuroń^{1,3}

¹Department of Surgical Research and Transplantology, Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

²Clinical Department of Gastroenterological Surgery and Transplantation, Central Clinical Hospital of the Ministry of Interior, Warsaw, Poland

³Diagnostic Radiology Department, Central Clinical Hospital of the Ministry of Interior, Warsaw, Poland

Prz Gastroenterol 2014; 9 (6): 313–316

DOI: 10.5114/pg.2014.47892

Key words: pancreatic cancer, ploidy, DNA index.

Address for correspondence: Marek Durlik MD, PhD, Assoc. Prof., Clinical Department of Gastroenterological Surgery and Transplantation, Central Clinical Hospital of the Ministry of Interior, 137 Wotoska St, 02-507 Warsaw, Poland, phone: +48 22 508 10 20, e-mail: dyrekcja@cskmswia.pl, mdurlik@post.home.pl

Abstract

In Poland, pancreatic cancer is the seventh most common cause of cancer-related death amongst men and the sixth amongst women. Pancreatic cancer has an extremely poor prognosis. Radical surgery still remains the only way of curing pancreatic cancer, and this is possible to perform in just 20% of cases, i.e. those that present localised disease upon diagnosis. An average survival of ~20 months post-resection and adjuvant chemotherapy has been observed in 10–15% of patients with tumours limited to the pancreas at the time of presentation. It is necessary to define strong prognostic factors to determine individual treatment and prognosis. In this paper we submit a review of the literature concerning the prognostic impact of the ploidy and the DNA index on the survival of patients who underwent resection of pancreatic ductal adenocarcinoma. However, the presented studies have produced conflicting results. Pancreatic cancer still remains a great challenge in medicine.

Introduction

According to the National Cancer Registry, in Poland there are over 3000 new cases of pancreatic cancer per year. Pancreatic cancer (PC) is the seventh most common cause of cancer-related death amongst men and the sixth amongst women.

In total 90% of pancreatic cancers are ductal adenocarcinomas (PDAC), which are known for their extremely poor prognosis. In most cases, at the time of diagnosis this malignant neoplasm is unresectable because of distant metastases. Seventy-four percent of patients die within the first year of diagnosis. Only about 20% of pancreatic cancer patients qualify for surgery, which is the only widely accepted curative treatment method. An average survival of ~20 months post-resection and adjuvant chemotherapy has been observed for 10–15% of patients with tumours limited to the pancreas at the time of presentation [1]. Gemcitabine is the standard chemo-

therapeutic agent in pancreatic cancer. Unfortunately, two-thirds of pancreatic tumours display low expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1), which mediates cellular entry of the drug, and do not respond to gemcitabine therapy. Other mechanisms of resistance to gemcitabine are deficient deoxycytidine kinase activity (these kinase phosphorylates gemcitabine to active metabolites) and overexpression of ribonucleotide reductase (one of the active metabolites of gemcitabine works by blocking these enzymes) [2].

Prognostic factors in pancreatic cancer

Many studies into the prognostic factors in pancreatic cancer have been conducted for a number of years. Prognostic factors allow clinicians to select the individual treatment strategy, and they can be divided into several groups, including the following: widely available blood tests, tumour markers, immunohistochemical

markers, histological staging and grading, the influence of administered therapy, clinical condition of the patient, and demographic factors. It is a broad subject, so we decided to highlight the most interesting data. Chiang *et al.* reported that patients with a better nutritional status (measured as having an albumin level greater than 3.5 g/dl), radical resection, early tumour stage, and better-differentiated tumours were associated with favourable survival [3]. Of great interest is a study carried out in 2012 by Sanjay *et al.* which showed that a pre-operative elevated serum C-reactive protein (CRP) level and raised post-operative lymph node ratio (ratio of positive over excised lymph nodes) represent significant independent prognostic factors that predict poor prognosis in patients undergoing curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma [4]. The results of the study conducted in 2011 by de Jong *et al.* are quite remarkable. The authors analysed 1697 cases of patients who underwent curative pancreaticoduodenectomy because of pancreatic adenocarcinoma in terms of tumour size, and they concluded that the cut-off value of 2 cm is not independently associated with the outcome; however, tumour size is strongly associated with the risk of other adverse prognostic factors. The effect of size on prognosis is largely attributable to these other biological factors rather than the size of the tumour itself [5]. Smith *et al.* performed a meta-analysis of immunohistochemical prognostic markers in resected pancreatic cancer. In this meta-analysis vascular endothelial growth factor (VEGF) emerged as the most potentially informative prognostic marker; Bcl-2, bax and p16 also returned significant overall survival differences, but in smaller patient series due to a lack of evaluable literature [6]. Boyd *et al.* reported that depression was a significant predictor of survival in patients with pancreatic cancer who underwent surgical resection (hazard ratio, 1.34; 95% confidence interval, 1.04–1.73) [7]. Wang *et al.* showed that patients with metabolic syndrome and pancreatic cancer had later disease staging and a poorer histological grade. They also demonstrated significantly poorer survival [8].

Genetic background of pancreatic cancer

A number of studies on the molecular level have been conducted to gain deeper insight into cancer biology. Analyses have shown that the most common genetic alterations identified to date in pancreatic cancer are activation of the KRAS oncogene and inactivation of the CDKN2/p16, TP53, and DPC4 tumour suppressor genes. Mutation of KRAS occurs in 80–95% of cases and mutation of CDKN2 in 75–95%. The association of these two mutations is not frequent in other cancers,

which is why it is called the “molecular fingerprint” of pancreatic cancer. Mutation of the TP53 suppressor gene affects more than half of PC tumours. Another suppressor gene, DPC4 (deleted in pancreatic cancer 4), is mutated in 50–55% of cases [9, 10]. Oshima *et al.* retrospectively analysed the relationship between selected clinical parameters and immunohistochemically detected expression of CDKN2A/p16, TP53, and DPC4. Abnormal immunolabelling of p53 was significantly associated with tumour dedifferentiation ($p = 0.022$) and the presence of locoregional recurrence ($p = 0.020$). Loss of CDKN2/p16 immunolabelling was associated with lymphatic invasion ($p = 0.012$) and postoperative widespread metastases ($p < 0.001$). A significant correlation was found between DPC4 immunolabelling and tumour size ($p = 0.006$), lymphatic invasion ($p = 0.033$), and lymph node metastasis ($p = 0.006$). Smith *et al.* conducted a meta-analysis related to resected PC, which confirmed a prognostic value for CDKN2/p16, but neither TP53 nor DPC4/smad4 was found to represent significant prognostic factors [6]. In studies of the molecular background of PC, authors have also described mutations of SWI/SNF (35% of cases), APC, MCC, DCC, BRCA2, and RB1 [9–12].

Ploidy and DNA index as prognostic factors in pancreatic cancer

Ploidy is the number of sets of chromosomes in the nucleus of a biological cell. A typical human somatic cell contains 46 chromosomes ($2n = 46$). This applies to somatic cells in the G0/G1 phase of mitotic cell cycle. Cells are described according to the number of sets present: haploid (1 set), diploid (2 sets), triploid (3 sets), tetraploid (4 sets), pentaploid (5 sets), hexaploid (6 sets), heptaploid/septaploid (7 sets), etc. The generic term polyploid is frequently used to describe cells with three or more sets of chromosomes (triploid or higher ploidy). Euploidy is the state of a cell or organism having an integral multiple of the monoploid number. For example, a human cell has 46 chromosomes, which is an integer multiple of the monoploid number, 23. A human with abnormal, but integral, multiples of this full set (e.g. 69 chromosomes) would also be considered as euploid. Aneuploidy is the state of not having euploidy. The DNA index is the mean nuclear DNA content of the G0/G1 compartment of the neoplastic cells population divided by the DNA content of the G0/G1 compartment of the known diploid reference cells.

Of interest to this paper is the relationship between the survival of patients operated upon because of pancreatic ductal adenocarcinoma and cancer cell ploidy (DNA index). Here, we can ask if there is any relationship between the resectability of pancreatic cancer and

Table I. Studies on the relationship between ploidy/DNA index and survival of patients operated upon because of pancreatic ductal adenocarcinoma

Authors	Design of study	No. of patients	Diploid (%)	Non-diploid (%)	Survival in diploid group [months]	Survival in non diploid group [months]	Value of <i>p</i>	DNA index	Value of <i>p</i>
Kamphues <i>et al.</i>	Prospect.	61	24.6	75.6	29.2	13.5	0.252	1.9	0.026
Yeo <i>et al.</i>	Retrospect.	119	43	57	24	11.5	0.0002	–	–
Berczi <i>et al.</i>	Retrospect.	22	63.6	36.4	10	8	> 0.05	–	–
Bui <i>et al.</i>	Retrospect.	20	35	65	17	7.5	< 0.03	–	–
Hyöty <i>et al.</i>	Retrospect.	53	79	21	14	9	0.11	1.0–3.21	–
Allison <i>et al.</i>	Retrospect.	47	40	60	25	10.5	0.003	–	–

DNA content. In the prospective study He *et al.* showed that there is a high correlation between the resectability of pancreatic cancers and their DNA ploidy status. In this study, a total of 36 patients with pancreatic adenocarcinoma were divided into resectable and unresectable groups. Statistical significance was found in DNA ploidy in both groups ($p < 0.05$). The rates of diploid/tetraploid and aneuploid were 66.7% and 33.3% in the resectable group, respectively, and 38.9% and 62.1% in the unresectable group, respectively ($p < 0.05$) [13].

The following is a presentation of studies on the relationship between the survival of patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma and their ploidy/DNA index. The results of similar studies are summarised in Table I.

Kamphues *et al.* reported that the DNA index represents an independent predictive marker in patients with pancreatic head cancer. In this prospective study, the DNA ploidy and the DNA index of 61 patients operated upon because of pancreatic head cancer were evaluated by DNA image cytometry. Of these, 15 tumours (24.6%) were identified as diploid and 46 (75.6%) as nondiploid. The median DNA index in the entire cohort was 1.9 (range: 1.0–2.5). The average survival of the study cohort was 17.5 months. In multivariate survival analysis, DNA index ($p = 0.026$) and lymph node status ($p = 0.007$) were identified as independent prognostic factors predicting the survival of the study cohort [14].

Yeo *et al.* showed that DNA content is one of the strongest predictors of outcome after pancreaticoduodenectomy in patients with adenocarcinoma of the head of the pancreas. Of the 119 patients whose tumours were analysed for DNA content, 51 (43%) had diploid tumours and 68 (57%) had aneuploid tumours. Patients with diploid tumours had a median survival of 24 months and a 5-year survival of 39%, significantly better than the average survival of 11.5 months and 5-year survival of 8% observed in patients with aneuploid tumours ($p = 0.0002$) [15].

Hyöty *et al.* reported that there is no correlation between ploidy/DNA index and survival in patients who had undergone resection of pancreatic cancer. The authors analysed 53 cases of resected pancreatic ductal adenocarcinoma. The DNA index ranged from 1.00 to 3.21. Aneuploidy was detected in 11 cases (21%). After excluding 8 patients who did not die from cancer, the average survival was 13 months. The survival of the patients with DNA-aneuploid tumours (median 9 months) did not differ significantly from that of the patients with diploid tumours (median 14 months), $p = 0.11$ [16].

In contrast to this study, Allison *et al.* obtained totally different results. In their study the DNA content of 47 adenocarcinomas arising in the head of the pancreas from patients who had undergone successful pancreaticoduodenectomy was measured. Of the 47 tumours, 19 (40%) were diploid and 28 (60%) were aneuploid cancers. The 19 patients with diploid cancers had an average survival time of 25 months. Average survival of the 28 patients with aneuploid cancers was 10.5 months. This difference was statistically significant ($p = 0.003$). A multivariate life table regression analysis demonstrated that the ploidy is an independent prognostic factor for patients with adenocarcinoma of the head of the pancreas, who have successfully undergone a pancreaticoduodenectomy [17].

The study conducted by Herrera *et al.* was slightly different. The authors hypothesised that if the ploidy pattern correlated to survival, recognition of this pattern should be more apparent in long-term survivors in a population of patients undergoing resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. In this retrospective study, 72 patients were divided into two groups according to the length of survival: the long-term survivors – group I (19 patients who survived 3 or more years after operation) and the short-term survivors – group II (43 patients who died within 12 months after resection). All hospital deaths (within 30 days of operation)

and patients who survived for at least 1 but less than 3 years after operation were excluded from this study. Because of poor-quality histograms the authors were unable to interpret 10 of the 72 samples evaluated. These patients were excluded from analysis. In 30 specimens (48%), the nuclear DNA pattern was diploid, whereas 32 were nondiploid (2 tetraploid and 30 aneuploid). In group I, 12 patients (63%) had DNA diploid tumours and 7 (37%) had a nondiploid DNA pattern, compared with 18 (42%) and 25 (58%), respectively, in group II. The DNA index of the 19 patients with long-term survival ranged from 1 to 1.86 (mean 1.1) and that of the 43 patients with short-term survival ranged from 1 to 2 (mean 1.2). There were no significant differences in the number of diploid/nondiploid patterns or DNA indices between the two groups [18].

Conclusions

Despite significant advances in the surgical and chemotherapeutic management of patients with pancreatic cancer in recent years, the prognosis is extremely poor. That is why many studies have focused on the reasons for the aggressive biology of pancreatic cancer and the prognostic values of different factors. Studies evaluating the prognostic impact of the ploidy and the DNA index have produced conflicting results. However, most of these studies were retrospective and based on the analysis of paraffin-embedded archival material, and therefore provided only limited evidence. Further, large, prospective studies are needed, and pancreatic cancer still remains a great challenge in medicine.

References

- Kaur S, Baine MJ, Jain M, et al. Early diagnosis of pancreatic cancer: challenges and new developments. *Biomark Med* 2012; 6: 597-612.
- Ansari D, Tingstedt B, Andersson R. Pancreatic cancer – cost for overtreatment with gemcitabine. *Acta Oncol* 2013; 52: 1146-51.
- Chiang KC, Yeh CN, Ueng SH, et al. Clinicodemographic aspect of resectable pancreatic cancer and prognostic factors for resectable cancer. *World J Surg Oncol* 2012; 10: 77.
- Sanjay P, de Figueiredo RS, Leaver H, et al. Preoperative serum C-reactive protein levels and post-operative lymph node ratio are important predictors of survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *JOP* 2012; 13: 199-204.
- de Jong MC, Li F, Cameron JL, et al. Re-evaluating the impact of tumour size on survival following pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2011; 103: 656-62.
- Smith RA, Tang J, Tudur-Smith C, et al. Meta-analysis of immunohistochemical prognostic markers in resected pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2011; 104: 1440-51.
- Boyd CA, Benarroch-Gampel J, Sheffield KM, et al. The effect of depression on stage at diagnosis, treatment, and survival in pancreatic adenocarcinoma. *Surgery* 2012; 152: 403-13.
- Wang DS, Wang ZQ, Zhang L, et al. Are risk factors associated with outcomes in pancreatic cancer? *PLoS One* 2012; 7: e41984.
- Oshima M, Okano K, Muraki S, 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.
- Howe JR, Conlon KC. The molecular genetics of pancreatic cancer. *Surg Oncol* 1997; 6: 1-18.
- Shain AH, Giacomini CP, Matsukuma K, et al. Convergent structural alterations define SWI/SNF chromatin remodeler as a central tumour suppressive complex in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: E252-9.
- Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, et al. Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. *Curr Genomics* 2011; 12: 15-24.
- He YC, Peng W, Qiao JG, et al. Relationship between nuclear morphometry, DNA content and resectability of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1863-5.
- Kamphues C, Al-Abadi H, Dürr A, et al. DNA index as a strong prognostic factor in patients with adenocarcinoma of the pancreatic head: results of a 5-year prospective study. *Pancreas* 2013; 42: 807-12.
- Yeo CJ, Cameron JL, Lillemoe KD, et al. Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. 201 patients. *Ann Surg* 1995; 221: 721-33.
- Hyöty M, Visakorpi T, Kallioniemi OP, et al. Prognostic value of analysis of DNA in pancreatic adenocarcinoma by flow cytometry. *Eur J Surg* 1991; 157: 595-600.
- Allison DC, Bose KK, Hruban RH, et al. Pancreatic cancer cell DNA content correlates with long-term survival after pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg* 1991; 214: 648-56.
- Herrera MF, van Heerden JA, Katzmann JA, et al. Evaluation of DNA nuclear pattern as a prognostic determinant in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg* 1992; 215: 120-4.

Received: 11.11.2013

Accepted: 30.11.2013